



UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA  
Facultad de Ciencias Químicas  
Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y ESTUDIO DE ACTIVIDADES  
ENZIMÁTICAS DE LEVADURAS VÍNICAS.  
MEJORA DE UNA CEPA DE *S. cerevisiae* CON EL GEN *PGU1***

**MÓNICA FERNÁNDEZ GONZÁLEZ**

**Ciudad Real, 2003**

**Genetic characterization and study of enzymatic activities in wine yeast.  
Improved of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with *PGU1* gene.**

**Abstract**

Yeasts isolated from must before and during fermentation at a wine cellar were characterised using PCR /RFLP and PCR/TTGE. *S. cerevisiae* strains were differentiated using mtDNA restriction analysis. Direct PCR-TTGE was also used to study biodiversity during wine fermentation, and revealed the variations in the population. It was observed that isolation by conventional plating may afford a skewed view of the strains taking part in wine fermentation.

Polygalacturonase activity in *S. cerevisiae* wine yeast strains was also studied. In the 61 assayed strains, was a great variability of results, for it a simple and repetitive quantification was completed method of using polygalacturonic acid as substrate. On the other hand it was analyzed by PCR and Southern the presence of the *PGU1* gene, encoding polygalacturonase activity, showing that some strains had it and they did not express this activity and others in which it was not amplified and that did not have activity, reason why the presence of the gene could be used like a genetic marker.

A pectinolytic industrial yeast strain of *S. cerevisiae* containing the *S. cerevisiae PGU1* endopolygalacturonase gene constitutively expressed under the *PGK1* promoter was generated. The new strain contains DNA derived exclusively from yeast and expresses a high polygalacturonic acid hydrolyzing activity. Microvinifications on white and red must were made, being that the extraction of the color and the must yield were significantly higher whereas the content in ethanol and the volatile ones analyzed were not modified.

$\beta$ -glucosidasic activity was also assayed in *S. cerevisiae* strains, finding that some of them could break the glycosidic bonds of some of the synthetic substrates depending on the conditions of growth. On the other hand, the hydrolysis of glycosides of moscatel must by different *Saccharomyces* and non *Saccharomyces* strains was analyzed. Of all the tried strains, *Hanseniaspora uvarum*, was the one that released a range of volatile analyzed by CG-MS. Finally, the glycosidic aromatic precursors of white grapes of neutral varieties by means of their chemical and enzymatic hydrolysis, and the effect of a *S. cerevisiae* wine strain were studied.

TÍTULO DE LA TESIS EN CASTELLANO:

OPTIMIZACIÓN DE CLUSTERS COMO PLATAFORMAS MULTIMEDIA  
UTILIZANDO CLIENTES PREDICTIVOS MULTITHREAD

TITULO DE LA TESIS EN INGLES:

CLUSTERS OPTIMIZATION AS MULTIMEDIA PLATFORMS USING  
PREDICTIVE MULTITHREAD CLIENTS

RESUMEN EN INGLÉS:

The development and wide deployment of digital video-based applications have spurred the need of high-performance parallel video processing systems. Clusters of workstations are seen as a technical feasible and economical viable solution on the development of high-performance video processing systems. Based on the results of our previous research efforts, we introduce in this work a novel predictive multithread NFS client. Throughout an in-depth analysis of our previous I/O performance results, we tune up the main parameters of the proposed mechanism for maximum performance. Our experimental results show that by properly tuning up the I/O system and by taking into account the application profile, a significant reduction on the time required in the processing of video can be achieved.

Cluster computing has become a natural way in the development of parallel video applications. However, there still exist a number of technical problems in the development of cost-effective cluster-based parallel processing systems. Among the major issues to be addressed, the performance of the I/O system plays a major role on the overall system performance. This is particularly true when dealing with applications characterized by the processing of large volume of information. In applications such as video processing, the data distribution among the various cluster nodes impose stringent requirement on the I/O system.

In this work, based on our previous research efforts, we introduce a novel pre-fetching mechanism to be incorporated into the NFS system architecture. By taking into account the results obtained from our previous studies, we show that the time required to carry video processing tasks, such as video compression, can be significantly reduced.

Nowadays, NFS is the most widely used network file system. The novelty of our work lies on the fact that we have carried out an extensive campaign of experiments whose main aim has been to study the dynamics of NFS. We have been particularly interested in identifying the main system parameters to be tuned for better performance.

**A Víctor**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de una forma u otra han contribuido a la realización de este trabajo.

A la Dra. Ana Isabel Briones Pérez y al Dr. Juan Úbeda Iranzo, por haberme dirigido esta tesis doctoral, por su confianza, apoyo y amistad.

A la Junta de Comunidades de Castilla la Mancha por la concesión de una beca para la elaboración de esta tesis, así como por la beca José Castillejo para la realización de estancias en el extranjero.

Al proyecto FEDER 1FD97-0165, sin el cuál no hubiera sido posible la elaboración de este trabajo.

Al Istituto Sperimentale per l'Enologia (Asti, Italia) y en particular al Prof. Rocco Di Stefano y a Ileana Ummano por iniciarme en la cromatografía de gases-espectrometría de masas.

A Stefano, Linda y Gloria Ambró por su hospitalidad y amistad durante mi estancia en Italia.

Al Dr. Antonio Jiménez y al Dr. Juan Carlos Espinosa del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (UAM) por su colaboración en este proyecto.

Al Dr. Ricardo Cordero y a D. Vasudevan Gururajan por la elaboración del plásmido pKUSa/b.

A las Bodegas Naranjo (Carrión de Cva.), Coop. San Isidro Labrador (Bolaños de Cva.), Coop. Santísimo Cristo Espíritu Santo (Malagón), por abrirnos sus puertas de forma desinteresada.

A mis compañeros del laboratorio de Microbiología, especialmente a Luisfer, por su amistad y ayuda prestada.

A mis padres y mis hermanas, por comprenderme en los momentos difíciles.

A Víctor, por su paciencia y su cariño.

La fruta fermenta de forma espontánea. Por lo tanto, el vino se produce de forma natural siempre que las levaduras transportadas por el aire entren en contacto con el jugo de las frutas. La elaboración del vino no es más que la supervisión y refinado de este proceso, y cabe asumir que se ha producido allá donde los seres humanos han vivido en las proximidades de viñas o parras silvestres.

**Martín A. Cagliani**

## ÍNDICE

<b>0 JUSTIFICACIÓN DEL TEMA</b>	<b>1</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>3 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LEVADURAS VÍNICAS</b>	<b>37</b>
3.1 Material y Métodos	39
3.2 Resultados	45
<b>4 MODIFICACIÓN GENÉTICA DE UNA LEVADURA VÍNICA CON EL GEN DETERMINANTE DE LA ENDOPOLIGALACTURONASA (PGU1)</b>	<b>57</b>
<b>4.A Selección de una cepa de levadura <i>S. cerevisiae</i> con actividad poligalacturonásica</b>	<b>61</b>
4.A1 Material y métodos	61
4.A2 Resultados	65
<b>4.B Construcción de una cepa de <i>S. cerevisiae</i> vínica UCLMS-1 con actividad pectinolítica</b>	<b>73</b>
4.B1 Material y métodos	73
4.B2 Resultados	87
<b>4.C Microvinificaciones con la cepa recombinante <i>S. cerevisiae</i> UCLMS-1M</b>	<b>103</b>
4.C1 Material y métodos	103
4.C2 Resultados	109
<b>5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD GLICOSIDÁSICA EN LEVADURAS VÍNICAS</b>	<b>115</b>
<b>5. A. Estudio de la actividad <math>\beta</math>-glucosidásica en cepas de <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>119</b>
5.A1 Material y métodos	119
5.A2 Resultados	123
<b>5.B Hidrólisis y transformación de los glicósidos de mosto moscatel por la acción de distintas especies de levaduras vínicas</b>	<b>129</b>
5.B1 Material y métodos	129
5.B2 Resultados	133

<b>5.C Fraccionamiento de los precursores glicosilados del aroma de uvas blancas. Hidrólisis y transformación por la acción <i>S. cerevisiae</i> UCLMS-1</b>	<b>141</b>
<b>5.C.1</b> Material y métodos	141
<b>5.C.2</b> Resultados	145
<b>6 CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>153</b>
<b>7 BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>159</b>
<b>8 TRABAJOS PUBLICADOS</b>	<b>175</b>



## **0. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA**

## **0. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA**

En Enología, independientemente de otros factores, las levaduras desempeñan un papel relevante en las características del producto final y existe la convicción de que para obtener vinos de calidad se requiere entre otros aspectos tecnológicos, la elección de una cepa de levadura adecuada.

Estudios recientes han puesto de manifiesto el potencial de las levaduras vínicas indígenas para producir enzimas interesantes en vinificación que modifiquen determinados componentes de los mostos y mejoren las propiedades sensoriales de los vinos.

El uso que de forma cada vez más frecuente se hace de los iniciadores en la industria vínica y la demostración de su implantación a partir de las etapas iniciales, ha simplificado el proceso desde el punto de vista biológico asemejándolo al de la industria cervecera, abriendo la puerta al uso de las técnicas de DNA recombinante en las levaduras vínicas.

Estrategias mixtas como el uso combinado de levaduras seleccionadas de la biota autóctona con determinadas características fermentativas y portadoras de los determinantes genéticos de enzimas específicos con propiedades adecuadas a los fines perseguidos, constituyen en la actualidad una interesante y práctica línea de trabajo junto a la aplicación de técnicas de biología molecular, para el clonaje de dichos enzimas en cepas de *Saccharomyces* vínicas.

Para facilitar la lectura de este manuscrito, se ha estructurado en una introducción general, seguida de tres capítulos diferenciados, el primero acerca de la caracterización genética de levaduras vínicas, el segundo de la modificación genética de una levadura vínica con el gen determinante de la endopoligalacturonasa (*PGU1*) y su efecto en el proceso de vinificación, el cuál se ha dividido en tres partes para su

mejor comprensión, y en el último se ha estudiado también en tres apartados la actividad glicosidásica de levaduras vínicas.

Este trabajo finaliza con los apartados de conclusiones generales, bibliografía y trabajos publicados.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. LEVADURAS VÍNICAS**

Todo vino es obra de levaduras, pero éstas se encuentran siempre, temporal y espacialmente, en situaciones ecológicas determinadas, condicionándose con ello el resultado del producto final.

De los 100 géneros que incluyen aproximadamente las 700 especies descritas en la última edición del manual “The Yeasts, a taxonomic study” (Kurtzman y Fleet, 1998), 15 están asociados con el proceso de vinificación: *Brettanomyces* y su forma perfecta *Dekkera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora* y su equivalente asexual *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces* y *Zygosaccharomyces* (Pretorius, 2000).

Desde hace años se conoce que la fermentación espontánea de los mostos por métodos tradicionales, no se lleva a cabo por una única especie o cepa de levadura, sino que el vino obtenido, es el resultado de la acción combinada de varias cepas que se desarrollan progresivamente a lo largo del proceso.

La fermentación vínica se inicia por el crecimiento de especies de *Kloeckera*, *Hanseniaspora* y *Candida* que predominan en las primeras etapas, seguida de varias especies de *Metschnikowia*, *Pichia* y *Hansenula* (actualmente asociada al género *Pichia*), en las etapas intermedias, cuando el etanol alcanza el 3-4%. Estas levaduras son productoras de un bajo grado alcohólico, de altas concentraciones de sustancias volátiles entre los que se encuentran algunos ésteres responsables del aroma afrutado. Las etapas finales de las fermentaciones vínicas están dominadas por especies pertenecientes al género *Saccharomyces* con distintas capacidades fermentativas y diferente grado de tolerancia al etanol.

Las levaduras responsables de la fermentación alcohólica tienen su origen en el hollejo de la uva, en la maquinaria de la bodega y en la adición de cultivos iniciadores.

La uva está considerada como la primera fuente de levaduras vínicas indígenas, y la población total y la proporción de individuos de cada especie esta influida por factores como el clima, el grado de maduración, el uso de fungicidas, los daños físicos producidos por insectos o pájaros y por la variedad de vinífera.

Las levaduras apiculadas de los géneros *Kloeckera* y *Hanseniaspora* son las especies predominantes, representando de un 50-75% de la población total. Se han aislado además especies de *Candida*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Rhodotorula* sin embargo, el género *Saccharomyces* se encuentra en muy pequeña proporción (Fleet y Heard, 1993, Fernández *et al.*, 2000).

La maquinaria (prensas, tanques, fermentadores, barricas, etc.) que entra en contacto directo con el mosto y el vino es la zona idónea para el desarrollo de una microbiota propia de cada bodega. *Saccharomyces cerevisiae* predomina en esas superficies, aunque también se han aislado otras especies de éste género, así como de *Candida*, *Pichia*, y *Brettanomyces* (Fleet y Heard, 1993). Por lo que estas variaciones en la cantidad y distribución de especies de levaduras contribuyen de forma importante a la diversidad en los ecosistemas y bodegas.

Durante los últimos años, algunas bodegas han usado para la elaboración de sus vinos, cultivos puros o mezclas de levaduras aisladas de sus propios mostos en fermentación, con la convicción de que una mejor adaptación de las cepas al entorno ecológico puede beneficiar la calidad del vino y, que éste mantenga las peculiaridades sensoriales típicas de cada región.

Así, la fermentación es dirigida por levaduras comerciales liofilizadas o secactivas. El inóculo microbiano, al ser mayoritario, de  $1-3 \times 10^6$  clas/mL, normaliza la biota inicial y, de esta forma, se obtiene una fermentación controlada año tras año. Evidentemente, el inóculo no puede ser una levadura cualquiera, sino que debe tratarse de una levadura seleccionada que evite anomalías como paradas

fermentativas, y en definitiva influya en una mejor calidad del vino, tanto del gusto como del aroma, produciendo unos cambios organolépticos deseables.

Mediante el uso de técnicas de biología molecular como el análisis de restricción del DNA mitocondrial, ha sido posible demostrar que una levadura inoculada se impone en el tanque de fermentación, y lo hace a unos niveles tales que conduce la fermentación vínica (Querol *et al.*, 1992a). Este hecho, junto al mayor conocimiento molecular de algunas de las rutas bioquímicas de interés industrial, ha permitido utilizar la biotecnología en las levaduras vínicas; el razonamiento es simple: la introducción de un gen exógeno en la levadura implica la producción de una característica de interés industrial, por lo que su inoculación e imposición asegura el predominio de dicha característica a lo largo de todo el proceso industrial, y por lo tanto su presencia en el producto final (Querol y Ramón, 1996).

### **1.1.1. Identificación de levaduras vínicas**

#### **1.1.1.1. Métodos clásicos**

Las levaduras se identifican por métodos clásicos a partir de criterios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos que son los normalmente utilizados en las claves de clasificación (Lodder y Kreger Van Rij, 1967; Lodder, 1970, Kreger Van Rij, 1984, Kurtzman y Fleet, 1998, Barnett *et al.*, 2000).

Los inconvenientes de estos métodos son que demandan mucho tiempo, son laboriosos y los caracteres fenotípicos pueden estar influidos por las condiciones del cultivo y de la variabilidad de las cepas, lo que conduce en algunas ocasiones a clasificaciones incorrectas e identificaciones dudosas.

Con el desarrollo de la biología molecular han surgido numerosas técnicas que se aplican en la actualidad para la identificación y clasificación de microorganismos, tanto en la discriminación inter como intraespecífica, ya que son más sensibles, específicas, reproducibles y de fácil manejo.

Así, la clasificación de las levaduras está sujeta a continuos cambios como consecuencia de la investigación que se está llevando a cabo en los últimos años y por consiguiente al desarrollo de nuevas técnicas moleculares. Así, mientras que en el año 1970 el número de especies de *Saccharomyces* era de 41 (Lodder, 1970), en 1990 era tan sólo de 7 (Barnett *et al.*, 1990). Las últimas ediciones de los manuales taxonómicos de levaduras, Kurtzman y Fleet, (1998) y Barnett *et al.* (2000), describen 14 y 16 especies distintas de *Saccharomyces* respectivamente.

#### **1.1.1.2. Métodos moleculares**

Los métodos basados en el DNA tienen la ventaja de ser independientes de la expresión de los genes y no dependen de las condiciones de cultivo, y en principio son útiles para evitar ambigüedades taxonómicas, simplificando la identificación. Los más empleados en el estudio de levaduras son:

##### **a) Electroforesis de cromosomas en campo pulsante**

Utilizando esta técnica es posible separar electroforéticamente en un gel de agarosa fragmentos de DNA de gran tamaño (de 250 a 2700 Kb), y por tanto los cromosomas intactos de las levaduras. Existen diferentes diseños para el estudio de los cariotipos por electroforesis: PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*), FIGE (*Field Inversion Gel Electrophoresis*), CHEF (*Contour-clamped Homogeneous Electric Fields*) y TAFE (*Transverse Alternating Field Electrophoresis*).

De los sistemas indicados, el CHEF basado en una combinación de técnicas electrónicas y electroforéticas, es el que ha demostrado una mayor eficacia en la resolución de grandes moléculas de DNA ya que a diferencia de otros sistemas, se consiguen campos eléctricos homogéneos, y se obtiene una buena reproducibilidad y poca distorsión de las bandas.



Varios autores han mostrado las diferencias de cariotipo electroforético existentes entre cepas de levadura cerveceras (Oackley-Gutowsky *et al.*, 1992, Sato *et al.*, 1994), y entre cepas de uso en enología pertenecientes a distintas colecciones (Westhuizen y Pretorius, 1992) o aisladas de la biota espontánea (Briones *et al.*, 1996; Nadal *et al.*, 1996; Izquierdo *et al.*, 1997).

### **b) Análisis de los fragmentos de restricción de longitud variable (RFLP)**

Los fragmentos de restricción se producen cuando se digiere el DNA con un tipo de enzimas, endonucleasas de restricción, que cortan la cadena por un punto determinado, caracterizado por una secuencia específica de nucleótidos que la enzima es capaz de reconocer. Así, si dos organismos difieren en una secuencia específica, el tamaño de los fragmentos producidos al tratar con una determinada endonucleasa de restricción, será diferente, pudiendo visualizarse la diferencia de tamaños en un gel de agarosa mediante electroforesis.

En el estudio de levaduras vínicas, esta técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorphism*) se utiliza principalmente para la restricción del **DNA mitocondrial** (Querol *et al.*, 1992b, Fernández-González *et al.*, 2001) y de diferentes fragmentos del **DNA ribosómico** previamente amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Baleiras Couto *et al.*, 1995; Masneuf *et al.*, 1996; Fernández *et al.*, 1999, 2000, Fernández-González *et al.*, 2001).

### **c) Detección de secuencias de DNA mediante el empleo de sondas.**

Las pruebas de hibridación mediante sondas de ácidos nucleicos para la detección de secuencias específicas de DNA o RNA, son muy utilizadas en una gran variedad de ensayos. Destaca la técnica *Southern blotting*, en donde el DNA de elevado peso molecular se digiere con enzimas de restricción. Los productos de digestión se separan mediante electroforesis y, una vez desnaturalizados son

transferidos por capilaridad a una membrana de nitrocelulosa o nylon que se incubaba con una sonda específica y marcada, de manera que los fragmentos de DNA que sean complementarios de ella, la retendrán y aparecerán como manchas en la autorradiografía (Southern, 1995).

La hibridación mediante diferentes sondas ha sido una de las técnicas que más impacto ha tenido en la taxonomía del género *Saccharomyces*, ya que permitía afianzar el nombre de algunas especies, reducir otros nombres a sinónimos (Vaughan-Martini y Martini, 1987; Vaughan-Martini y Pollacci, 1996) o describir otras nuevas (Vaughan-Martini, 1995; Vaughan-Martini *et al.*, 1996).

#### **d) Secuenciación nucleotídica**

La secuenciación del DNA permite conocer la composición y el orden en el que se encuentran los nucleótidos.

La comparación de las secuencias de los genes ribosomales (5,8S, 18S y 26S, actualmente 25S), ha sido muy útil para establecer relaciones filogenéticas entre los distintos niveles taxonómicos. El análisis filogenético del género *Saccharomyces* basado en la secuenciación del gen 18S rRNA, demostró que este género es muy heterogéneo y que sus especies se encuentran entremezcladas con especies de *Zygosaccharomyces*, *Torulaspora* y *Kluyveromyces*. No obstante las cuatro especies pertenecientes al grupo *Saccharomyces sensu stricto*, *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus* y *S. pastorianus*, están muy cercanas entre sí, y constituyen un grupo bastante diferenciado de otras especies del mismo género y de otros géneros (James *et al.*, 1997).

La información proveniente de la secuenciación de los genes ribosomales puede ser utilizada para seleccionar oligonucleótidos específicos que amplifiquen determinadas regiones del DNA, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La secuenciación total del genoma de organismos se convirtió en realidad en 1995, con la obtención de la primera secuencia completa de una bacteria, *Haemophilus influenzae* (Fleischmann, *et al.*, 1995). Desde entonces, muchos otros genomas se han añadido a la lista, incluyendo el del primer eucariota, la levadura *S. cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1997).

Los hitos más importantes han sido marcados en los últimos años por la obtención de los genomas de *Drosophila melanogaster* (Adams *et al.*, 2000), el primer insecto, *Arabidopsis thaliana*, la primera planta (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), y por supuesto, el genoma humano (*Homo sapiens*) (Lander *et al.*, 2001). El último eucariota secuenciado hasta el momento es el mosquito de la malaria (*Anopheles gambiae*) (Holt *et al.*, 2002).

### **e) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Para la caracterización genética de las levaduras los oligonucleótidos más utilizados son: los aleatorios (RAPD), los microsatélites y los de secuencia conocida, seleccionados según la región que se quiera amplificar.

La **RAPD-PCR** (Random Amplified Polymorphic DNA) utiliza un único iniciador corto (10pb), y de secuencia arbitraria. Este iniciador hibrida en secuencias homólogas distribuidas al azar por todo el genoma, permitiendo la amplificación de numerosos fragmentos de DNA. En una única reacción de RAPD se generan numerosos productos de longitud nucleotídica variada. El patrón de secuencias amplificadas es, por tanto, específico de las cepas ensayadas y constituye un perfil de la identidad del microorganismo. Aquellos aislados que presenten el mismo patrón de polimorfismo con un cebador determinado se pueden considerar que tienen una misma identidad clonal.

Esta técnica tiene la ventaja de no requerir un conocimiento previo de la secuencia del DNA a amplificar para diseñar la composición nucleotídica de los iniciadores, ya

que utiliza *primers* aleatorios. Se ha utilizado en la caracterización de especies de *Saccharomyces* (Grando *et al.*, 1994, Molnàr *et al.*, 1995, Baleiras-Couto *et al.*, 1996).

Los genomas de los organismos superiores presentan un gran número de secuencias repetidas. En particular, los **microsatélites** o SSR (simple sequence repeats) están constituidos por secuencias cortas de nucleótidos de dos a seis pares de nucleótidos (GTG)<sub>n</sub>, (GATA)<sub>n</sub>, repetidas en tandem, flanqueadas por regiones conservadas, que permiten su amplificación mediante PCR.

Se generan de esta manera fragmentos de distintos tamaños que se separan en un gel de electroforesis, y dan lugar a patrones de DNA que permiten discriminar a nivel interespecífico, y en ocasiones intraespecífico. Se ha empleado para la diferenciación de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Baleiras-Couto *et al.*, 1996, González Techera *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2001)

La información obtenida a partir de la secuenciación de los genes ribosomales, ha sido utilizada para sintetizar **primers específicos** que amplifiquen determinadas regiones del rDNA nuclear mediante PCR, y dependiendo del grado de conservación de las mismas regiones se puede diferenciar a distintos niveles taxonómicos. De esta forma, White *et al.* (1990) sintetizaron oligonucleótidos basados en secuencias muy conservadas, que permitieron la amplificación de regiones del rDNA de los hongos filamentosos y de las levaduras estudiadas.

Existen varios estudios que amplifican todo el rDNA nuclear, hablando entonces de ribotipado (Messner y Prillinger, 1995; Smole Mozina *et al.*, 1997), algunos la región comprendida entre el 5,8S y 18S (Laidlaw *et al.*, 1996), y otros la región 5,8S-ITS (Valente *et al.*, 1996; Guillamón *et al.*, 1998, Fernández *et al.*, 1999, 2000 y Fernández-González, *et al.*, 2001). Esteve-Zarzoso *et al.* (1999), diferenciaron unas especies de otras sometiendo al amplificado de la región 5,8S-ITS, a la restricción con distintas endonucleasas. Fernández-Espinar *et al.* (2000) consiguieron diferenciar e identificar especies del género *Saccharomyces*, mediante esta técnica, renombrar

algunas especies mal identificadas por métodos clásicos, y obtener perfiles característicos para las levaduras de flor.

#### **f) Electroforesis en gradientes desnaturalizantes**

Existen diferentes métodos desnaturalizantes que utilizan los geles de poliacrilamida para separar moléculas de DNA:

##### **DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)**

La técnica DGGE, es un método electroforético usado para identificar pequeñas modificaciones en una determinada secuencia de DNA, detectando polimorfismos no identificables por otras técnicas como RFLP. La separación se basa en el hecho de que las moléculas de DNA que se diferencian en una única base migran de manera diferente en un gel de poliacrilamida, el cual contiene un gradiente lineal de agentes desnaturalizantes como la urea y la formamida. La electroforesis se realiza a una temperatura constante y puede ser perpendicular o paralela a la dirección del campo eléctrico.

Esta técnica se ha empleado en estudios de diversidad bacteriana en diferentes ambientes acuáticos, amplificando la región 16S rDNA (Muyzer *et al.*, 1995, Murray *et al.*, 1996) y para distinguir la mayoría de los géneros de levaduras asociados con la elaboración de vino, una parte del gen 26S rRNA (Cocolin *et al.*, 2000a)

##### **TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis)**

La técnica TTGE, es un método electroforético que utiliza un gradiente lineal de temperatura en presencia de una concentración constante de desnaturalizante, en gel de poliacrilamida.

Mediante TTGE, se pueden separar los fragmentos de DNA con la misma longitud, pero diferente secuencia nucleotídica, debido a su distinta movilidad

electroforética cuando se desnaturalizan parcialmente por un gradiente lineal de temperatura. Cuando la molécula de DNA alcanza su temperatura de fusión ( $T_m$ ) se produce una transición de la doble hélice a una molécula parcialmente desnaturalizada, deteniéndose. Así a igual tamaño entre dos fragmentos, la fusión del DNA depende de la proporción y posición de las bases G+C.

La técnica TTGE, ofrece nuevas perspectivas tanto en el campo de la taxonomía de levaduras como en el estudio de la dinámica de poblaciones (Hernán-Gómez *et al.*, 2000, Fernández-González *et al.*, 2001) y se presenta como un método conveniente y alternativo en el estudio de la región 16S rDNA para revelar la heterogeneidad en cepas de bacterias (Felske *et al.*, 1999, Cocolin *et al.*, 2000b).

## **1.2. LAS ENZIMAS EN ENOLOGÍA**

Las enzimas juegan un papel definitivo en el antiguo y complejo proceso de vinificación así, desde un punto de vista científico y técnico, el vino puede entenderse como el producto de la transformación enzimática del mosto de uva.

Desde la etapa prefermentiva, pasando por la fermentación, post-fermentación y envejecimiento, las enzimas catalizan las reacciones de biotransformación, y en el proceso de conversión de los azúcares en dióxido de carbono y etanol, intervienen al menos una decena de enzimas distintas.

Por lo tanto, es de gran importancia comprender la naturaleza y el comportamiento de las enzimas y crear las condiciones óptimas para explotar aquellas que sean beneficiosas e inhibir aquellas otras que van en detrimento de la calidad del vino.

En las últimas décadas las preparaciones enzimáticas comerciales han ganado en popularidad en enología para suplementar o complementar las enzimas endógenas derivadas de la uva y de los microorganismos presentes.

Para dar respuesta a las siempre crecientes demandas de los enólogos y de los consumidores hacia la mejor calidad del vino a un menor precio, es inevitable que se busquen nuevas enzimas para procesos específicos, que se podrían añadir al mosto y al vino, o bien introducir sus genes en una levadura vínica usada como cultivo iniciador.

Desde que se conoce la secuencia completa del genoma de *S. cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1997), está en la lista de microorganismos GRAS (Generally Recognized As Safe) y secreta solo pequeñas cantidades de enzimas, las cepas de *S. cerevisiae* recombinantes proporcionan un camino conveniente para la expresión de enzimas específicas, sin actividades residuales no deseadas.

### **1.2.1. Enzimas pectinolíticas**

#### **1.2.1.1. Estructura de las sustancias pécticas**

Las pectinas son heteropolisacáridos, y los principales constituyentes de la lamina media y pared primaria celular de las plantas superiores. Son las responsables de la integridad y coherencia de los tejidos vegetales y además de su función como agentes lubricantes y cementantes, están involucradas en las interacciones entre la planta y el ataque de patógenos (Van Rensburg y Pretorius, 2000).

En la industria alimentaria, las pectinas pueden originar problemas, durante la extracción, filtración y clarificación de los zumos de frutas, por la turbidez y viscosidad que comunican a los mismos.

Estructuralmente, las pectinas están formadas por un eje lineal de residuos de ácido D-galacturónico que presenta ramificaciones, principalmente de galactosa, arabinosa y ramnosa (De Vries *et al.*, 1983). El eje lineal estaría formado por un homogalacturonano, mientras que los bloques ramificados incluirían los ramnogalacturonanos I y II (Fischer y Bennett, 1991) a los que se asocian los arabinogalactanos (Keegstra *et al.*, 1973); en la **Figura 1.1**, se representa de forma esquemática la estructura de las sustancias pécticas así como las enzimas implicadas en su degradación.

#### **Homogalacturonano**

Constituido por restos D-galacturonosil unidos mediante enlaces  $\alpha(1-4)$ , entre los que aparece intercalado algún resto L-ramnosil unido por enlaces  $\alpha(1-2)$ . La esterificación parcial de los ácidos galacturónicos por el metanol (sobre su función carboxílica) o por el ácido acético (en posición O-2 y O-3) crea una heterogeneidad, por lo que las cadenas homogalacturónicas se caracterizan habitualmente por sus grados de polimerización y de metilación.



**Ramnogalacturonano I (RG I)**

Presenta una estructura central que, en su mayor parte, está formada por la repetición del disacárido ácido galacturónico-ramnosa unidos por enlaces  $\alpha(1-2)$ ,  $\alpha(1-4)$  (McNeil *et al.*, 1982). Además, aproximadamente la mitad de los residuos de ramnosa presentan en posición 4 cadenas laterales ricas en monosacáridos (arabinosa, galactosa, xilosa,...), galactanos, arabinanos y/o arabinogalactanos, dando al RG-I una estructura fuertemente ramificada, alternadas con las cadenas homogalacturónicas o “lisas” (Saulnier y Thibault, 1987)

**Ramnogalacturonano II**

El ramnogalacturonano II (RGII) es un polisacárido péctico complejo, de grado de polimerización débil. Se han podido detectar hasta doce azúcares diferentes, muchos de ellos poco frecuentes en otros polisacáridos, como la metil-fucosa, la 2-O-metil-fucosa (McNeil *et al.*, 1984) o el ácido acérico (Spellman *et al.*, 1983, Vidal *et al.* 2000), sólo encontrado en este polisacárido.

El RGII está basado en una cadena principal de 8 residuos de ácido galacturónico unidos en  $\alpha(1-4)$ , similar a las cadenas de homogalacturanos, pero que lleva 4 cadenas laterales bien definidas (Puvanesarajah *et al.*, 1991), dos de disacáridos y dos de octasacáridos. Todo esto le confiere a la molécula de RGII una resistencia a la degradación por las pectinasas de las preparaciones enzimáticas comerciales y por ello, permanece inalterable en el zumo de frutas y en los vinos tratados con estos preparados. (Doco *et al.*, 1997)

**Arabinogalactanos I y II**

Están formados por una cadena central de restos D-galactosil unidos mediante enlaces  $\beta(1-4)$ , con ramificaciones de tres tipos: restos arabinosil, restos galactosil y cadenas de  $\beta(1-3)$ -galactano que presentan sustituciones arabinosil en el carbono 6 (Kato y Nevins, 1983). En las paredes celulares se han encontrado dos clases distintas

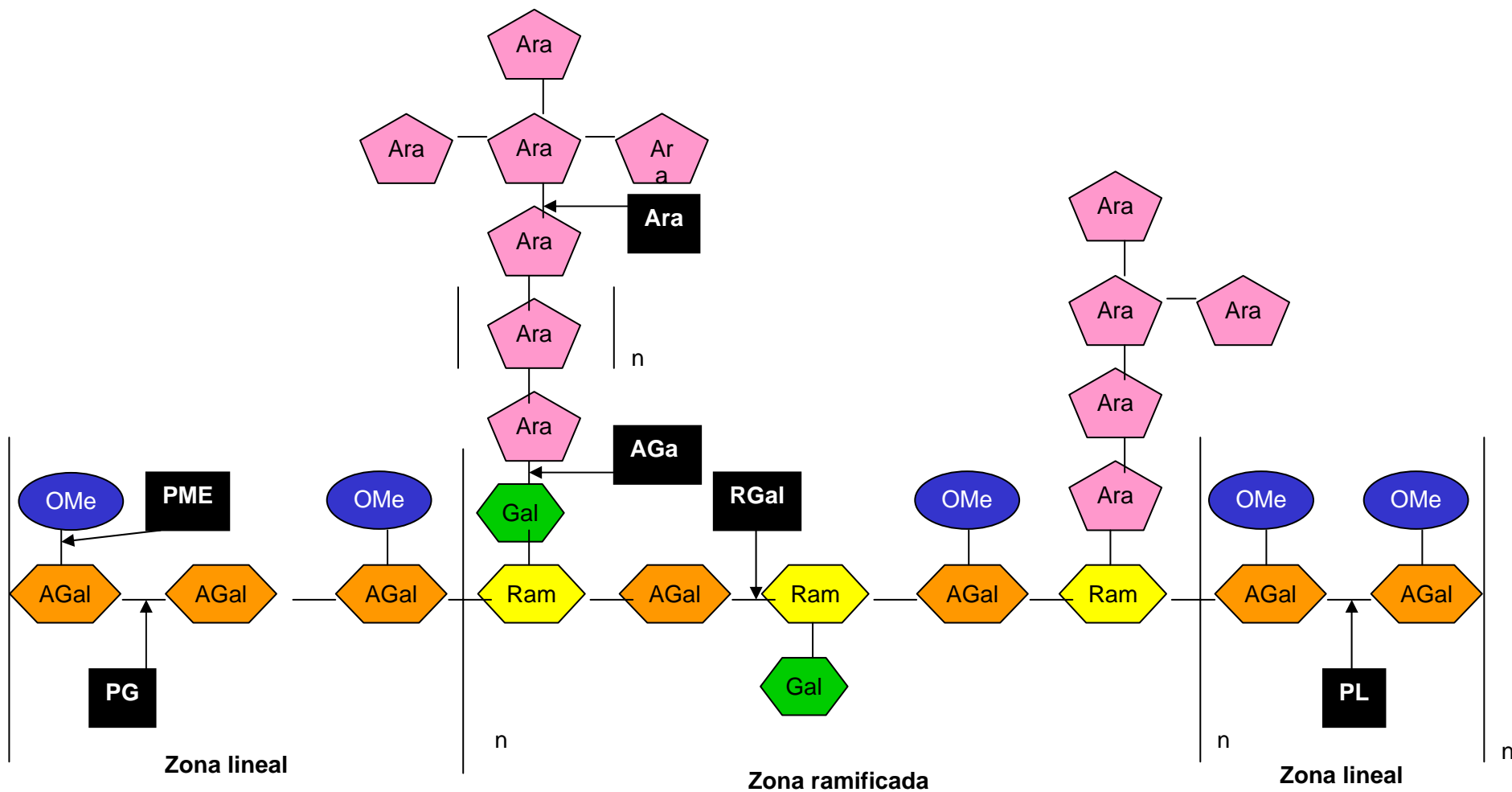
de arabinogalactanos: El arabinogalactano I presenta restos L-arabinofuranosil unidos en las cadenas laterales. Este polisacárido péctico parece no solubilizarse, y por lo tanto no se encuentra en los mostos, ni en los vinos (Brillouet, 1987, Doco *et al.*, 1996).

El arabinogalactano II es un polisacárido altamente ramificado con cadenas de residuos  $\beta$ -D-galactopiranosas unidos por enlaces  $\beta(1-3)$  en el eje lineal y  $\beta(1-6)$  en las cadenas laterales (Aspinall, 1980). Se han encontrado también arabinogalactanoproteínas, que son proteoglicanos, formados por la unión covalente entre un arabinogalactano de estructura similar a la de las cadenas laterales de RGI, y un péptido rico en hidroxiprolina (Saulnier y Brillouet, 1989, Saulnier *et al.*, 1992).

#### **1.2.1.2. Hidrólisis enzimática de las sustancias pécticas**

En vinificación se utilizan las pectinasas para mejorar los rendimientos de extracción de mosto por degradación de los polisacáridos estructurales que interfieren en la extracción (Sims *et al.*, 1988), para aumentar la liberación de compuestos del color y del aroma en los mostos antes y durante la fermentación y la maceración, así como, para facilitar la clarificación y filtración de los vinos (Villetaz, 1990, 1996 y Servili *et al.*, 1992).

Además de las pectinasas procedentes de la uva, varias enzimas pectinolíticas terminan en el mosto y el vino originadas por la microflora asociada con las bayas o de la fermentación. Uno de los hongos infectivos más importante en la uva es *Botrytis cinerea*, responsable de la podredumbre gris o noble. Este moho produce varias enzimas extracelulares incluyendo pectinasas, cuya concentración en uvas infectadas es unas 200 veces superior a las uvas sanas.



**Figura 1.1.** Estructura y enzimas implicadas en la degradación de la pectina. AGal: ácido galacturónico, Ram: ramnosa, Gal: galactosa, Ara: arabinosa, OMe: metoxilo, PME: Pectinmetilesterasa, PG, poligalacturonasa, PL, pectinliasa, Rgal:ramnoqalacturonasa, AGa:arabinogalactosidasa, Ara:arabinonasa

Las enzimas pectinolíticas sintetizadas por las plantas y por los microorganismos pueden actuar, o bien, hidrolizando el enlace éster entre el ácido galacturónico y el metanol (pectinmetilesterasas), o escindiendo el enlace glicosídico de los polímeros específicos (poligalacturonasas, pectin y pectato liasa)

La pectinmetilesterasa (PME) (EC 3.1.1.11) rompe el enlace éster entre el metanol y el grupo carboxílico del ácido galacturónico, dando lugar a pectinas de bajo metoxilo, liberando metanol. Esta acción no es despolimerizante.

La poligalacturonasa (PG) hidroliza los enlaces glicosídicos  $\alpha(1-4)$  entre dos residuos de ácido galacturónico con absorción de una molécula de agua. Como actúan sobre moléculas con grupos carboxílicos libres, en ausencia de pectinmetilesterasas, tienen poco efecto sobre pectinas altamente metiladas. Su acción es sinérgica a la de la pectinmetilesterasa actuando después de que ésta haya intervenido.

Hay dos tipos de poligalacturonasas con diferente función tecnológica, las exopoligalacturonasas (EC 3.2.1.40) que rompen los grupos terminales de la molécula de pectina, resultando en una escasa reducción de la longitud de la cadena y las endopoligalacturonasas (EC 3.2.1.15) que actúan al azar sobre todos los enlaces de la cadena, con consecuencias más rápidas e incisivas en las dimensiones moleculares y originando un rápido descenso de la viscosidad.

La pectinliasa (PL) (EC.4.2.2.10) y la pectatoliase (PAL) (EC.4.2.2.2), permiten la ruptura de los enlaces de las cadenas poligalacturónicas, mediante un mecanismo de *trans*-eliminación, dando un doble enlace entre el C4 y C5 por cada enlace glicosídico roto, en las unidades de ácido galacturónico esterificado y no esterificado, actuando frente a pectinas de alto y bajo metoxilo respectivamente.

Las enzimas involucradas en la hidrólisis de las sustancias pécticas neutras se han asociado a las hemicelulasas y se han clasificado en función de la naturaleza de las moléculas que son capaces de hidrolizar (arabinanosas, galactanosas).

### **1.2.1.3. Avances en el estudio de las pectinasas en levaduras**

Las enzimas pectinolíticas se encuentran principalmente en los mohos y en las bacterias, pero también están presentes en algunas levaduras. Debido al papel desempeñado por las levaduras, especialmente del género *Saccharomyces*, en la industria de los alimentos, sería interesante profundizar en el estudio de sus enzimas pectinolíticas, con dos objetivos: o bien utilizar la levadura para sintetizar las enzimas y posteriormente purificarlas y adicionarlas a los zumos de frutas para favorecer así la clarificación y la extracción o bien, como ocurre en los productos fermentados, que la levadura produzca la enzima directamente durante el proceso, sin necesidad de ser adicionada al medio.

La mayoría de los preparados comerciales de pectinasas usados en la industria de los alimentos, proceden de *Aspergillus niger*, que además de producir grandes cantidades de estas enzimas es considerado un microorganismo GRAS. Sin embargo este moho secreta además de las enzimas de interés, otras menos deseables en la producción de vino o de zumos de frutas, como por ejemplo la arabinofuranosidasa que puede causar turbidez (Whitaker, 1984).

Como uno de los habitats naturales de las levaduras es la fruta madura, es bastante probable que hayan desarrollado estas actividades para optimizar su crecimiento. Así según Blanco *et al.* (1999), algunas cepas de levaduras (*S. cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*) que secretan un solo tipo de enzimas pécticas y no presentan PME serían una fuente alternativa de pectinasas.

La capacidad de *S. cerevisiae* para degradar el ácido poligalacturónico podría tener importantes consecuencias en la fermentación de sustratos derivados de plantas (Mc Kay. 1990), quién estudió 33 cepas de las que 9 degradaron el ácido poligalacturónico durante su crecimiento en medio líquido o sólido suplementado de glucosa.

Gainvors *et al.* (1994a) encontraron que la cepa SCCP, identificada como *S. cerevisiae*, fue capaz de producir tres tipos de enzimas pectinolíticas PME, PL y PG y además demostraron (Gainvors *et al.*, 1994b) que cuando a un mosto fresco se le adicionaba el extracto enzimático de dicha cepa, se obtenían los mismos resultados sobre la turbidez, que cuando se añadía la misma cantidad de la preparación enzimática comercial Endozyme (Pascal Biotech SARL-París).

Blanco *et al.* (1997) observaron que al vinificar con cepas *S. cerevisiae* PG+, en algunos casos se reducía el tiempo de filtración en un 50% aproximadamente, sin obtener cambios apreciables en la viscosidad.

Probablemente el principal problema de utilizar enzimas pectinolíticas de levaduras en el procesado industrial, reside en los bajos rendimientos de actividad en la fermentación; por lo que una alternativa sería clonar y sobreexpresar los genes estructurales responsables de estas actividades enzimáticas, obteniendo así una cepa de levadura vínica que facilitara la clarificación del mosto y del vino durante la fermentación con la consiguiente ventaja económica. Estas cepas podrían además incrementar el color y el aroma de los vinos (Van Rensburg y Pretorius, 2000).

En los últimos años las estrategias usadas han sido varias:

Se han introducido en *S. cerevisiae* los genes de la PL (*pelE*) de *Erwinia crysanthemii* y de la PG (*peh1*) de *E. caratova*, en diferentes cassettes de expresión-secrección, combinando promotores de levaduras y bacterias, secuencias de secreción de señal y terminadores de genes, mejorando la degradación de los pectatos (Laing y Pretorius, 1992, 1993). Además, a estos cassettes se le unió la construcción *END1* (endo- $\beta$ -1,4-glucanasa), se co-expresaron en cepas de *S. cerevisiae* vínicas y de destilerías, y los ensayos revelaron que las enzimas eran biológicamente activas.

Templeton *et al.* (1994), insertaron el gen de PL (*pnlA*) de *Glomerella cingulata*, bajo el control del promotor *GAL10*, en levadura, cuya expresión fue muy limitada. Después esta expresión se mejoró cambiando la secuencia anterior al codón de iniciación CACAAUG, por otra más convencional y mejor reconocida por *S. cerevisiae* CAAAAUG, contribuyendo al incremento de la actividad pectinolítica de 6-10 veces en la cepa transformada.

En un estudio similar, pero independiente, se expresó de forma exitosa en *S. cerevisiae* el cDNA del gen endopoligalacturonasa de *A. niger* bajo el control del promotor *ADH1* (Lang y Looman, 1995).

González-Candelas *et al.* (1995), intentaron construir una levadura vínica pectinolítica introduciendo el gen *PELA* (cDNA) de *Fusarium solani* unido al promotor del gen de la actina de *S. cerevisiae*, sin embargo, la pectato liasa solo se secretó al medio de cultivo durante la fase estacionaria y la cepa recombinante produjo un vino con las mismas características físico-químicas que el obtenido con la misma cepa no transformada, lo que pudo atribuirse a problemas estructurales de la proteína debido a la presencia de 12 restos de cisteína.

Otros genes como el *PSE3* de *Trichosporon penicillatum* se ha sobreexpresado en *S. cerevisiae* con grandes incrementos en sus rendimientos comparados con las cepas salvajes (Iguchi *et al.*, 1997). Blanco *et al.* (1998), sobreexpresaron en diferentes cepas de laboratorio el gen *PGU1* (*PGL1*, *PSM1*), procedente de *S. cerevisiae* y responsable de la actividad endopoligalacturonásica.

Gognies *et al.* (1999), clonaron y secuenciaron este gen y encontraron que había pocas diferencias entre la secuencia de aminoácidos codificada por el gen *PGL1-1* de una cepa PG+ (SCCP) y la codificada por el gen *PGL1-2* de una cepa PG- (X2180-1B). De los dos genes, sólo el aislado de la cepa SCPP(*PGL1-1*) fue capaz, una vez sobreexpresado de conferir actividad endopoligalacturonásica a una cepa de laboratorio *S. cerevisiae*. Estas secuencias mostraron un 25-26% de similitud con las

endoPG procedentes de plantas y bacterias, un 43-53% con las de hongos y un 72% con la de *Kluyveromyces marxianus* (Jia y Wheals, 2000).

Gainvors *et al.* (2000) purificaron y caracterizaron la endopoligalacturonasa codificada por el gen *PGL1-1*, siendo activa a pH comprendido entre 3 y 5,5 y con una temperatura óptima de 25°C.

Un año más tarde Gognies *et al.* (2001), estudiaron la regulación de la expresión del gen de la endopoligalacturonasa *PGU1(PGL1)* en *Saccharomyces*, utilizando el DNA genómico de las cepas SCCP y X2180-1B, anteriormente citadas; para ello, amplificaron las secuencias promotoras de los genes *PGU1-1* y *PGU1-2* y las usaron para construir fusiones génicas con el gen de la  $\beta$ -galactosidasa y así poder comparar la expresión de dichos promotores en diferentes condiciones.

La actividad de las células con el promotor procedente de la cepa SCCP fue dos veces menor a las que contenían el de la cepa X2180-1B, resultado sorprendente teniendo en cuenta la elevada actividad pectinolítica de la cepa SCCP comparada con la X2180-1B. Actualmente se sigue experimentando para aclarar porqué el promotor del gen *PGU1-1* es más débil que el del *PGU1-2*.

Vilanova *et al.* (2000), vinificaron con una cepa industrial *S. cerevisiae* recombinante, transformada con el plásmido pBJ16-*PGU1* (Blanco *et al.*, 1998), que sobreexpresaba el gen *PGU1*, mejorando los tiempos de filtración, conservando la tipicidad de los vinos blancos obtenidos y sin un incremento apreciable en los niveles de metanol.



## **1.2.2. Importancia de las glicosidasas en el aroma del vino**

### **1.2.2.1. Los precursores glicosilados del aroma**

En los últimos años se ha puesto en evidencia y se ha estudiado de manera intensa, los precursores de los aromas. Estos compuestos inodoros, que provienen de la uva, son susceptibles de liberar sustancias olorosas bajo la influencia de diversos factores biológicos, biotecnológicos y físico-químicos.

Los precursores glicosilados son muy numerosos y relativamente abundantes, se encuentran en las uvas, principalmente en forma de disacáridos glicosídicos: 6-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosil- $\beta$ -D-glucopiranosidos (arabinosilglucósidos), 6 - O -  $\alpha$  - L - ramnopiranosil -  $\beta$  - D - glucopiranosidos (rutinósidos) y 6-O- $\beta$ -L-apiofuranosil- $\beta$ -D-glucopiranosidos (apiosilglucósidos), aunque, también se pueden encontrar en forma de monosacáridos como  $\beta$ -D-glucopiranosidos (Williams *et al.*, 1982a; Gunata *et al.*, 1988).

La parte aglicona está a menudo formada por: terpenoles, siendo los principales, el linalol, el nerol y el geraniol; óxidos de linalol; dioles y trioles terpénicos; alcoholes cíclicos o lineales (hexanol, feniletanol, alcohol bencílico); C13 norisoprenoides; ácidos fenólicos y fenoles volátiles como la vanillina (Williams *et al.*, 1981, Di Stefano, 1982, Voirin *et al.*, 1990, Baek y Cadwallader, 1999, Di Stefano *et al.*, 2000).

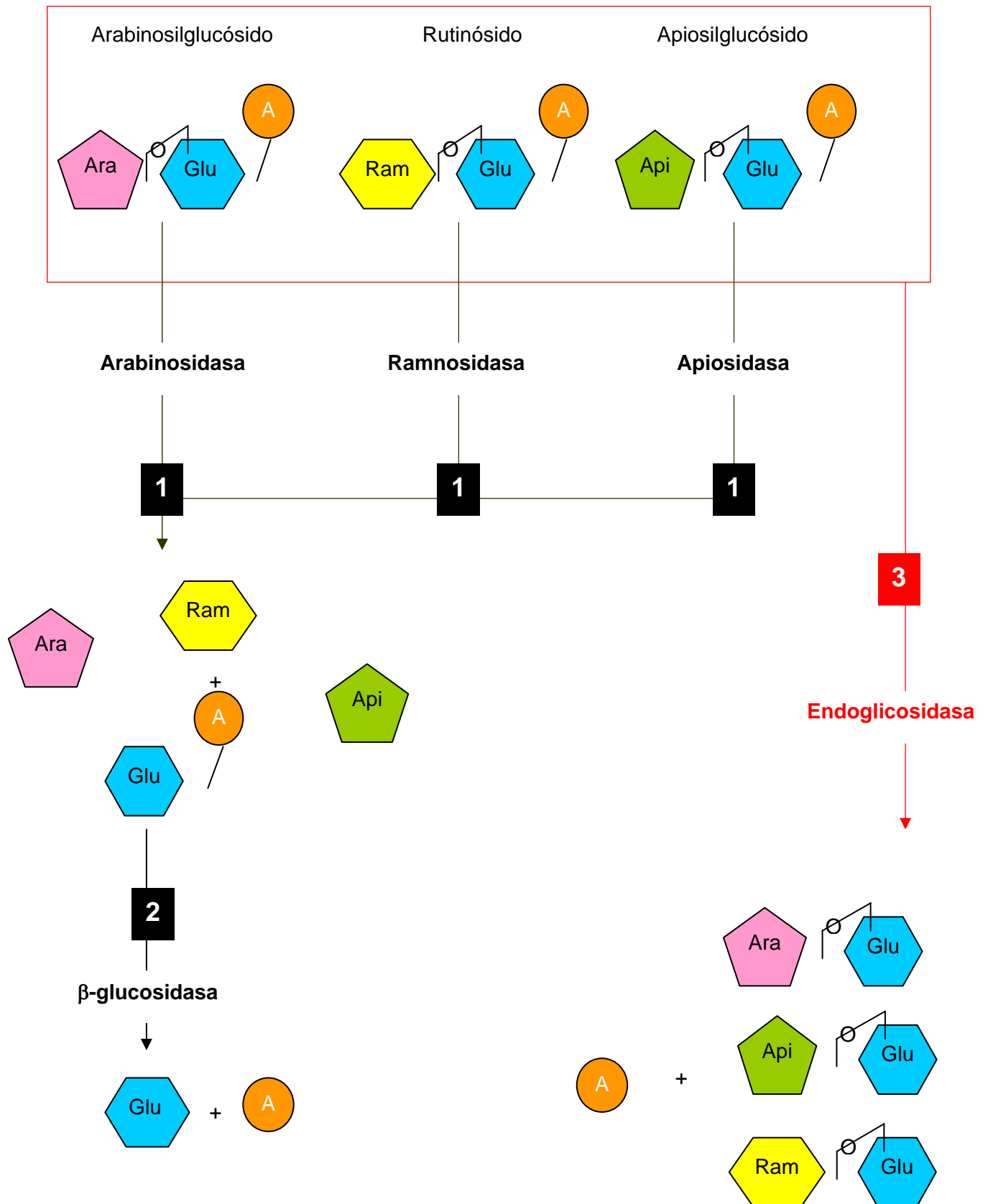
La liberación de ciertos alcoholes terpénicos no está solo relacionada con la hidrólisis de su correspondiente glicósido sino que las agliconas terpénicas están involucradas en otras reacciones químicas de isomerización, hidratación o reducción y en la actividad metabólica de las levaduras vínicas (Di Stefano, 1992).

#### **1.2.2.2. Mecanismos de hidrólisis de los precursores del aroma**

Hasta hace poco tiempo se pensaba que la hidrólisis enzimática de los precursores del aroma, era un proceso secuencial que requería en primer lugar la acción de la  $\alpha$ -L-arabinosidasa,  $\alpha$ -L-ramnosidasa o  $\beta$ -L-apiosidasa, para romper la unión del disacárido, y que posteriormente la aglicona olorosa era liberada por la acción de una  $\beta$ -glucosidasa (**Figura 1.2**) (Gunata *et al.*, 1988).

Recientemente, Gunata *et al.* (1998) han detectado e identificado una endoglicosidasa o disacaridasa del hollejo de la uva, capaz de hidrolizar el enlace heterosídico de los glicósidos y liberar la aglicona y el disacárido en una sola etapa.

Este segundo mecanismo proporciona un interés incuestionable en enología ya que se podría explotar el potencial aromático en un único paso sin que sea necesario el uso de sistemas multienzimáticos. Además la actividad de esta enzima tiene la ventaja de que apenas se inhibe por la glucosa, al contrario de lo que ocurre para la mayoría de las  $\beta$ -glucosidasas.



**Figura 1.2.** Mecanismos de hidrólisis de los precursores del aroma. 1 y 2. Hidrólisis secuencial  
3. Hidrólisis en una etapa

### **1.2.2.3. Origen de las glicosidasas**

Numerosos autores (Bayonove *et al.*, 1984; Aryan *et al.*, 1987; Cordonnier *et al.*, 1989; Gunata *et al.*, 1990a) han estudiado que los monoterpenoles pueden ser liberados de los compuestos glicosídicos mediante la acción de diversas enzimas exógenas. La actividad y funcionalidad de estas enzimas, varían notablemente según su origen, y en consecuencia el perfil aromático liberado, dependerá no sólo de la composición en agliconas terpénicas sino de la procedencia de la enzima empleada.

Las glicosidasas endógenas de la uva (Bayonove *et al.*, 1984) y de las cepas de levaduras vínicas (*S. cerevisiae*) (Gunata *et al.*, 1986) muestran actividades muy limitadas durante el proceso de vinificación. Las de la uva se caracterizan por ser específicas respecto a la aglicona, tienen una actividad óptima a pH 5, siendo poco activas a pH comprendido entre 3 y 4 y son inhibidas a concentraciones de glucosa superiores al 1% (Bayonove *et al.*, 1984; Aryan *et al.*, 1987); además, son incapaces de hidrolizar azúcares conjugados a alcoholes terciarios como el linalol, y algunos pasos como la clarificación y la centrifugación afectan a su actividad; por lo que son poco efectivas para ensalzar el aroma durante el procesado del mosto y las operaciones de vinificación.

Las  $\beta$ -glucosidasas de origen fúngico disminuyen fuertemente su actividad a concentraciones de glucosa por encima de 1-1,5% (Cordonnier *et al.*, 1989), aunque Riou *et al.* (1998), encontraron que la procedente de *Aspergillus* sp., no se inhibía por la glucosa y era estable al pH del mosto. Las procedentes de las levaduras *Candida molischiana* y *Candida wickerhamii* son menos sensibles a la glucosa y tienen una amplia especificidad por la aglicona (Gunata *et al.*, 1990b).

#### 1.2.2.4. Enzimas glicosidásicas en levaduras

Se ha estudiado la presencia de enzimas glicosidásicas en las levaduras enológicas y su relación con la producción de compuestos volátiles responsables del aroma del vino. Mientras que *S. cerevisiae*, no se caracteriza por ser una gran productora de enzimas extracelulares, las denominadas levaduras no *Saccharomyces* (incluyendo géneros como *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* y *Zygosaccharomyces*) se han descrito como fuentes potenciales de glicosidasas (Rosi *et al.*, 1994, Charoenchai *et al.*, 1997, Fernández *et al.*, 2000, Mendes-Ferreira *et al.*, 2001, Hernández *et al.*, 2002, Fernández-González *et al.*, 2003).

Algunas  $\beta$ -D-glucosidasas (antocianin- $\beta$ -D-glucosidasas o antocianasas) pueden tener un efecto adverso sobre el color del vino (Wrolstad *et al.*, 1994), debido a su capacidad de romper la unión entre el azúcar y el antociano, liberando la antocianidina que espontáneamente se transforma en compuestos marrones o incoloros (Huang, 1955; Blom, 1983). Manzanares *et al.* (2000) encontraron que *Hanseniaspora osmophila* y *Pichia anomala*, poseían actividad  $\beta$ -D-glucosidásica y apenas alteraban el color, lo que sería interesante para la vinificación en tinto.



## **2. OBJETIVOS**





## **2. OBJETIVOS**

Los objetivos del presente trabajo son los siguientes:

- [1] Aislamiento de levaduras *Saccharomyces* y no *Saccharomyces* a partir de mosto y mosto-vino por siembra en los medios sólidos adecuados; identificación mediante PCR/RFLP y caracterización por PCR/TTGE.
- [2] Caracterización directa de la población levaduriforme presente durante la fermentación vínica (PCR-RFLP, PCR-TTGE).
- [3] Selección de una cepa de *S. cerevisiae* con actividad poligalacturonásica.
- [4] Aplicación de técnicas de biología molecular para el clonaje de dichas enzimas en cepas de *Saccharomyces* vínicas con interesantes cualidades enológicas. Estudio de su efecto en el proceso de vinificación.
- [5] Estudio de la actividad glicosidásica en levaduras vínicas, sobre sustratos glucosilados sintéticos, y glicósidos aislados a partir de uvas blancas aromáticas y no aromáticas.



### **3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LEVADURAS VÍNICAS**



### **3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LEVADURAS VÍNICAS**

En este capítulo se pretende abordar los siguientes aspectos: por una parte la identificación de levaduras vínicas mediante una técnica molecular habitual (PCR-RFLP) y otra novedosa (PCR-TTGE), y por otra la aplicación de estas mismas técnicas, directamente, sobre las muestras de mosto/vino para estudiar la dinámica poblacional del tanque en fermentación sin realizar un aislamiento previo.

#### **3. 1. MATERIAL Y MÉTODOS**

##### **3.1.1. Toma de muestras**

Durante la vendimia de 1998, se realizó un muestreo en una bodega acogida a la D.O. La Mancha, de un tanque de fermentación de acero inoxidable ( $2 \times 10^5$  L de capacidad) con temperatura controlada y sin la adición de cultivos iniciadores para la elaboración de sus vinos.

Se tomaron muestras de mosto blanco (antes y después de clarificar) y a lo largo de los distintos días de fermentación, resultando un total de 8, para lo cuál se utilizaron frascos estériles y se trasladaron al laboratorio en condiciones de refrigeración. La evolución de la fermentación se siguió mediante aerometría, además se midió el pH y el contenido de  $\text{SO}_2$  total.

##### **3.1.2. Obtención de los aislados**

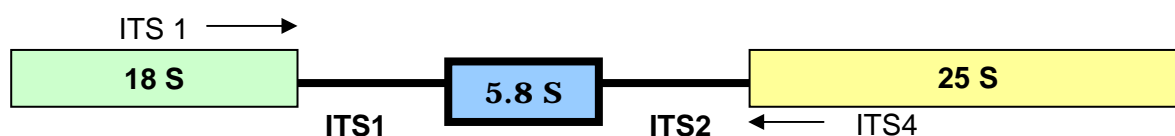
Se realizaron diluciones seriadas de las distintas muestras y 0,1 mL se sembraron en superficie en agar Wallenstein (Oxoid). Tras la incubación a 30°C durante 48 horas, se recontaron las colonias obtenidas de cada muestra, y se seleccionaron un total de 52 aislados, que aparentemente presentaban diferente morfología colonial. Una vez hechas las siembras, las muestras se adicionaron de glicerina hasta una concentración final del 15% (v/v) y se conservaron congeladas a -40°C para su posterior estudio.

### 3.1.3. Caracterización molecular de los aislados

Para la caracterización de los aislados se emplearon distintas técnicas de biología molecular que proporcionan información complementaria. En primer lugar se aplicó la técnica PCR-RFLP para identificar los aislados que posteriormente se caracterizaron mediante PCR-TTGE. Los identificados como *S. cerevisiae* se sometieron a un análisis de restricción del DNA mitocondrial (mtDNA) para la discriminación a nivel de cepa.

#### 3.1.3.1. PCR-RFLP

Se utilizaron los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 descritos por White *et al.* (1990), que amplifican la región 5,8S rDNA delimitada por dos zonas variables ITS1 e ITS2 (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Región 5,8S-ITS del rDNA amplificada mediante los oligonucleótidos ITS1/ITS4.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp 2400 PCR System (Perkin-Elmer).

El volumen de reacción fue de 50  $\mu$ L con una concentración final de 1,25 U AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems), 1  $\mu$ M de cada oligonucleótido ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTTATTGATATGC-3'), 0,2 mM de cada dNTP, 1X AmpliTaq Gold buffer II, 1,5 mM  $MgCl_2$ , y una colonia aislada o 1ng de DNA genómico.

El programa de amplificación fue: 95°C/5 min, seguido de 40 ciclos de 95°C/1 min, 58°C/2 min, 72°C/3 min, y una incubación final de 72°C/10min, para completar la extensión de todas las cadenas (Fernández *et al.*, 1999). Este programa de amplificación se redujo, por otro de menos duración y con idénticos resultados, ya que los fragmentos a amplificar tenían un tamaño máximo de 850 pb. El programa fue el siguiente: 95°C/10 min, seguido de 30 ciclos de 95°C/30s, 58°C/30s y 72°C/30s y 72°C/5min para la extensión de las cadenas.

### **Análisis de restricción (RFLP)**

Las secuencias amplificadas fueron sometidas a restricción con las enzimas *HinfI*, *HaeIII*, *CfoI* (Roche) para la identificación de las levaduras a nivel de especie. En algunos casos para establecer esta identificación de forma correcta, fue necesario el uso de *DdeI* y *HpaII* (Roche). Las digestiones se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **3.1.3.2. PCR-TTGE.**

Esta técnica consiste en la amplificación de un determinado fragmento de DNA de la levadura a estudiar, que posteriormente es sometido a una electroforesis en gradiente de temperatura, lo cuál origina en función de la composición de las cadenas de DNA, fragmentos con diferente movilidad electroforética dependiendo de su punto de fusión.

La región amplificada para el análisis comprendía aproximadamente 240 pb (pares de bases) del extremo 5' de la región 18S rDNA (Hernán-Gómez *et al.*, 2000). La mezcla de reacción de 50 µL contenía, 1,25 U de *AmpliTaq Gold* polymerase, 1X *AmpliTaq Gold* buffer II, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 1 µM de cada oligonucleótido YUNIV1 (5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG

GCA CGG GAG CCT GAG AAA CGG CTA CCA C-3') e YUNIV3 (5'- TTC AAC TAC GAG CTT TTT AA -3'), y una colonia ó 1ng del DNA genómico. La mezcla se calentó a 95 °C/10 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C/1min, 52 °C/1,5min y 72 °C/2min y 72 °C/7min para la extensión final.

Una secuencia rica en GC de 32 pb "GC clamp" unida al extremo 5' del primer YUNIV1, coamplifica y así se introduce en el fragmento de DNA amplificado. Esta secuencia actúa como un dominio de alta fusión previniendo que las dos cadenas de DNA se disocien completamente en cadenas simples (Muyzer y Somalla, 1998), aumentando la sensibilidad de la técnica.

### **Análisis mediante TTGE**

Se preparó un gel de poliacrilamida al 8 % (160x160x1mm<sup>3</sup>), 6M de urea, 1,25x TAE (Tris-Acetato-EDTA), 0,1% TEMED, 0,1% de persulfato amónico y 5 mL de una solución del 40% acrilamida/bis (37,5:1).

Al DNA amplificado (10 µL) se le adicionaron 3 µL de tampón de carga (0,05 % de azul de bromofenol, 0,05% xileno cianol, 70 % glicerol en dH<sub>2</sub>O) y se cargó en el gel de poliacrilamida.

La prueba se realizó en el aparato TTGE (BioRad), a 130 V durante 3 h, con gradiente de temperatura de 62 a 65 °C en paralelo a la migración. Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (0,5 µg·mL<sup>-1</sup>) y se visualizaron a la luz ultravioleta (Hernán-Gómez *et al.*, 2000).

### **3.1.3.3. Análisis de restricción del DNA mitocondrial.**

Los aislados identificados como pertenecientes a *Saccharomyces cerevisiae* se crecieron 18-24 h en 5 mL YPD (extracto de levadura 1 %, peptona 2 %, glucosa 2 %)



y se procedió al análisis de restricción siguiendo el método propuesto por Querol *et al.* (1992b). Una vez extraído el DNA, se digirió con la endonucleasa de restricción *Hinfl*.

#### **3.1.4. Caracterización directa de la población levaduriforme presente durante la fermentación.**

Una vez descongeladas las muestras de mosto-vino se tomaron 12 mL, que se centrifugaron (2260 g, 4°C/10min) y el sedimento obtenido se lavó cuidadosamente tres veces con volúmenes iguales de agua destilada estéril y otras tres con TE (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM, pH8). Tanto el agua estéril como el TE se preenfriaron previamente a 4°C. Las células lavadas se utilizaron para el aislamiento del DNA genómico (Rose *et al.*, 1990), el cuál, se sometió por un lado a la prueba PCR-RFLP y por el otro a PCR-TTGE.

##### **3.1.4.1. PCR-RFLP**

Mediante la técnica PCR-RFLP se trató de identificar las especies presentes en una muestra recogida de un tanque de fermentación, utilizando el DNA obtenido directamente de la muestra sin el aislamiento previo.

Para la reacción de amplificación, se usó 1 ng del DNA extraído y el programa descrito anteriormente para amplificar la región ITS-5,8S rDNA para la identificación de los aislados.

Una vez purificada cada banda de amplificación y suponiendo que cada una correspondía a una especie distinta, se trataron separadamente con las distintas endonucleasas de restricción, recurriendo a las bases de datos elaboradas por Esteve-Zarzoso, *et al.* (1999) y Fernández-Espinar, *et al.* (2000), para obtener la correcta identificación de los amplificados

### 3.1.4.2. PCR-TTGE

La región 18S rDNA del DNA obtenido de las diferentes muestras se amplificó utilizando el programa descrito anteriormente y realizando posteriormente el análisis TTGE.

### 3.1.5. Electroforesis en geles de agarosa

Para la separación de las moléculas de DNA de tamaños comprendidos entre 0,1 y 60Kpb, se realizaron electroforesis horizontales de geles de agarosa (concentraciones 0,3-2%) en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE 1X), teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y sumergidos en tampón TBE 1X (Sambrook *et al.*, 1989).

Concentración del gel de agarosa (% w/v)	Rango de peso molecular (kpb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

La purificación de fragmentos de DNA se realizó a partir de geles de agarosa con tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X) (Sambrook *et al.*, 1989), utilizando el Kit GeneClean Bio101 (La Jolla), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

En todos los casos los fragmentos de DNA se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografiaron con una cámara Polaroid MP-4 utilizando película 667 (Polaroid Corporation, Cambridge, M.A., USA).

Como marcadores moleculares se utilizaron:

**Marker II:** (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 bp) y **Marker VIII:** (1114, 900, 692, 501-489, 404, 320,242, 190, 147, 124, 110, 67, 37/34/34/26/19 bp) (Roche).

**100bp ladder:** (1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp) (Biotools).

## 3.2. RESULTADOS

De los aislados obtenidos a partir de las 8 muestras estudiadas se escogieron 52 que se analizaron mediante técnicas moleculares.

### 3.2.1. Caracterización molecular de los aislados

#### 3.2.1.1. PCR-RFLP

Cuando se amplificó la región 5,8S-ITS rDNA, los tamaños de amplificado que variaron entre 475 y 850 pb, fueron suficientes para obtener polimorfismo porque la región amplificada contenía una zona variable (ITS), lo que permitió agrupar a los aislados en 4 perfiles diferentes.

Con el fin de incrementar el polimorfismo y poder identificarlos, los amplificados se digirieron con las endonucleasas de restricción *HinfI*, *CfoI* y *HaeIII*, obteniéndose un numero de fragmentos visibles en el gel, desde uno (es decir, ningún corte del amplificado) hasta cuatro, con tamaños comprendidos entre 150 hasta 365 pb para *HinfI*, 90 a 750pb para *HaeIII* y 80 a 375 pb para *CfoI*. Por estas bandas de restricción los aislados se pudieron identificar a nivel de especie (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999, Fernández *et al.*, 1999 y Fernández-González *et al.*, 2001).

En el caso de los aislados identificados como pertenecientes al género *Hanseniaspora* fue necesario el uso de *DdeI* para poder discriminar entre *H. guilliermondii* y *H. uvarum*; La digestión con *HpaII* permitió identificar correctamente a los aislados pertenecientes a *S. cerevisiae*. (Fernández-Espinar *et al.*, 2000).

En la **Tabla 3.1** se indica la longitud del amplificado (A), así como el número y tamaño de los fragmentos de restricción, el número de aislados incluidos en cada perfil y su identificación a nivel de especie.

Hay que hacer notar que para *S. cerevisiae* el análisis de la secuencia ITS1-5,8S-ITS2, incluida en el cromosoma XII y recogida en la base de datos del genoma de *S. cerevisiae* (SGD, <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>), tiene un

tamaño de amplificado de 841pb, y al cortarlo con las enzimas de restricción se obtienen los fragmentos teóricos de: *HinfI*: 362, 354, 117, 8; *HaeIII*: 311, 229, 172, 129; *CfoI*: 132, 10, 363, 336 y *HpaII*, 725, 126.

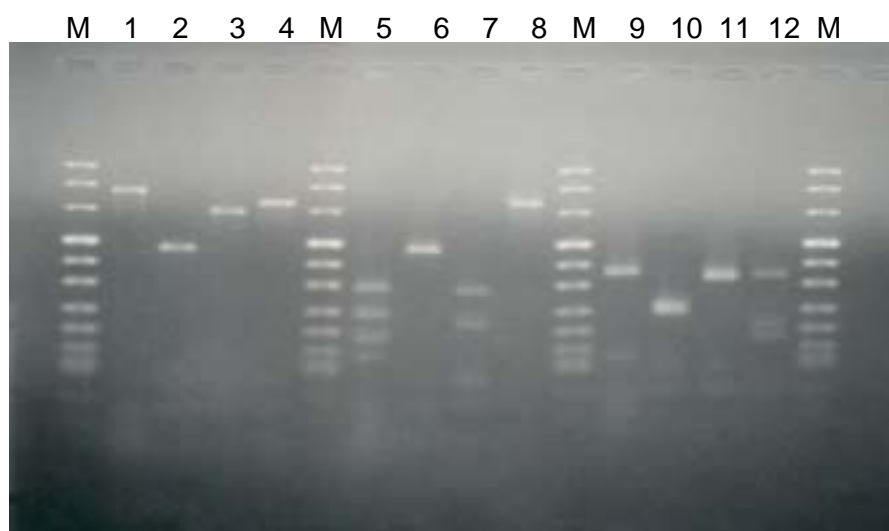
**Tabla 3.1.** Perfiles moleculares e identificación de los aislados, mediante PCR (5,8S-ITS)-RFLP.

A (pb)	<i>HaeIII</i> (pb)	<i>HinfI</i> (pb)	<i>CfoI</i> (pb)	Identificación	Aislados
850	320, 230, 180, 150	365, 150	375, 325, 150	* <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
475	475	235, 235	215, 110, 80	<i>Candida stellata</i>	14
700	310, 215, 90, 90	355, 345	315, 285, 95	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	5
750	750	350, 200, 180	320, 310, 105	** <i>Hanseniaspora uvarum</i>	5
750	750	350, 200, 180	320, 310, 105	** <i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	1

\**S. cerevisiae* se diferenció de *S. pastorianus* mediante restricción con *HpaII* y \*\**H. uvarum* y *H. guilliermondii* con *DdeI*.

En la **Figura 3.2** se observa el tamaño de los fragmentos amplificados y la digestión con las enzimas *HinfI* y *HaeIII*. El 52% de los aislados correspondieron al género *Saccharomyces* y el resto a levaduras no *Saccharomyces*; entre estas últimas, la más frecuente fue *Candida stellata* (27%), seguida de *Hanseniaspora uvarum* y *Kluyveromyces thermotolerans* con un 10% cada una y por último la presencia de *Hanseniaspora guilliermondii* (2%) fue testimonial.

En la **Tabla 3.2** se recoge la evolución de la densidad del mosto durante la fermentación, el recuento total de levaduras en las distintas muestras y los géneros aislados. El contenido de SO<sub>2</sub> total y el pH durante la fermentación fueron de 45 ppm y 3,8 respectivamente.



**Figura 3.2.** Gel de agarosa al 2 % con los productos de amplificación de la región 5,8S-ITS del rDNA para cuatro especies diferentes (carreras 1-4). Digestión de los amplificados obtenidos utilizando las enzimas de restricción *HaeIII* (carreras 5-8) y *HinfI* (carreras 9-12). Carreras M, marcador (marker VIII). Carreras 1, 5, 9: *Saccharomyces cerevisiae*; carreras 2, 6, 10: *Candida stellata*; carreras 3, 7, 11: *Kluyveromyces thermotolerans*; carreras 4, 8, 12: *Hanseniaspora uvarum*.

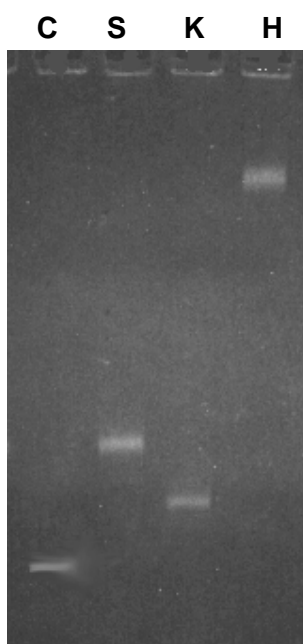
**Tabla 3.2.** Evolución de la densidad del mosto/vino, del recuento total de levaduras a lo largo de la fermentación y de los géneros aislados.

Muestra	Densidad (g/L)	Recuento total (ufc/mLx10 <sup>6</sup> )	Géneros aislados
M1	1089	2	<i>Candida</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Hanseniaspora</i> <i>Saccharomyces</i>
M2	1088	14	<i>Candida</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Hanseniaspora</i> <i>Saccharomyces</i>
F1	1074	45	<i>Candida</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Hanseniaspora</i> <i>Saccharomyces</i>
F2	1050	92	<i>Saccharomyces</i> , <i>Candida</i>
F3	1025	97	<i>Candida</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Saccharomyces</i>
F4	1020	108	<i>Candida</i> , <i>Saccharomyces</i>
F5	1000	170	<i>Candida</i> , <i>Saccharomyces</i>
F6	996	73	<i>Saccharomyces</i>

M1. Mosto sin clarificar, M2. Mosto clarificado, F(1-6). Mosto en fermentación

### 3.2.1.2. PCR-TTGE.

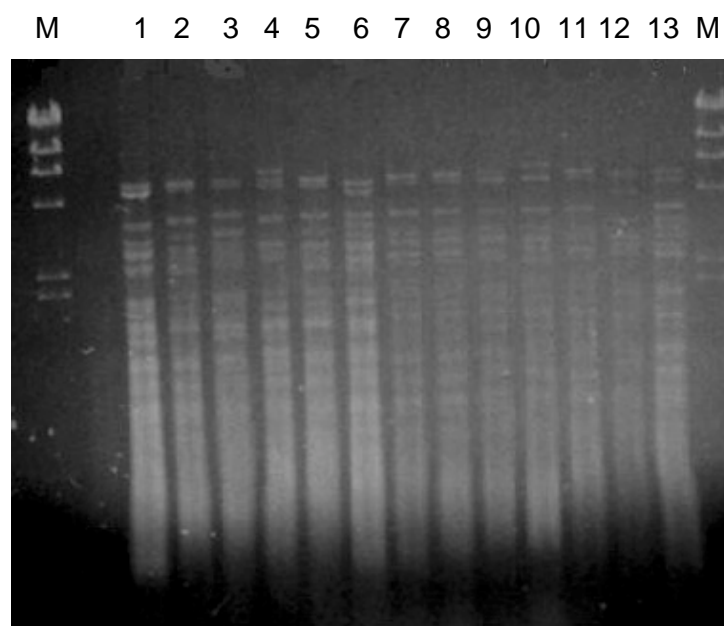
Con objeto de conocer los perfiles TTGE de las cepas identificadas previamente mediante PCR-RFLP, se amplificó una parte del gen 18S rDNA obteniendo un tamaño de amplificado en todos los casos de 244 bp. Al aplicar esta técnica, de nuevo se obtuvieron 4 bandas de distinta movilidad electroforética, correspondientes a 4 géneros diferentes: *Hanseniaspora* que presentó la menor movilidad y *Candida* la mayor, y los otros dos géneros fueron *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* (Figura 3.3). *H. uvarum* y *H. guilliermondii*, no pudieron ser discriminadas mediante esta técnica, y tampoco se observaron diferencias intraespecíficas, siendo estos resultados concordantes con los obtenidos por Hernán-Gómez *et al.* (2001).



**Figura 3.3.** Análisis TTGE de cuatro de las especies aisladas. Carrera C: *Candida stellata* carrera S: *Saccharomyces cerevisiae*; carrera K: *Kluyveromyces thermotolerans*; carrera H: *Hanseniaspora uvarum*.

### 3.2.1.3. Caracterización de cepas de *S. cerevisiae*.

Mediante la técnica mtDNA-RFLP y bajo comparación visual, se encontró que los 27 aislados de *Saccharomyces cerevisiae*, correspondieron a 16 perfiles diferentes, repitiéndose 4 de ellos en algunas de las etapas, lo que puso de manifiesto que en el tanque muestreado existía una amplia diversidad genética lo que es habitual en las fermentaciones espontáneas de esta región (Briones *et al.*, 1996 e Izquierdo *et al.*, 1997), debido además a que se eligieron aquellas colonias con una morfología diferente sobre agar W.L. Algunos de los perfiles más característicos se muestran en la **Figura 3.4**.



**Figura 3.4.** Patrones del DNA mitocondrial digeridos con *Hinfl*, correspondientes a diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Carreras 1 a 13) Carreras M, Marcador (Marker II)

### 3.2.2. Estudio directo de la dinámica poblacional durante la fermentación vínica.

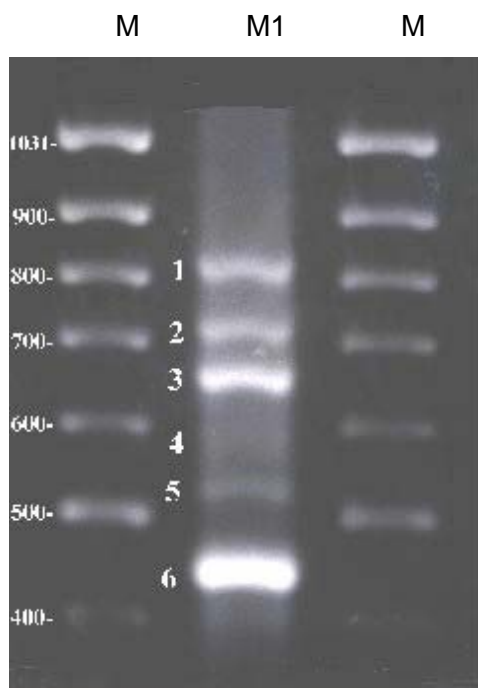
Hasta ahora casi todos los intentos por caracterizar la biodiversidad microbiana en las fermentaciones vínicas, han empleado técnicas de enriquecimiento y aislamiento antes de la identificación taxonómica, por lo que los microorganismos que no pudieran crecer en los medios de laboratorio estándar, sólo podrían ser detectados mediante técnicas moleculares como las que se proponen a continuación.

Este ensayo se realizó sobre las muestras con glicerol al 15% que se habían conservado a  $-40^{\circ}\text{C}$ . Una vez descongeladas, se comprobó mediante siembra en placa, que los recuentos de células viables eran similares a los obtenidos antes de la congelación, y las especies encontradas fueron idénticas.

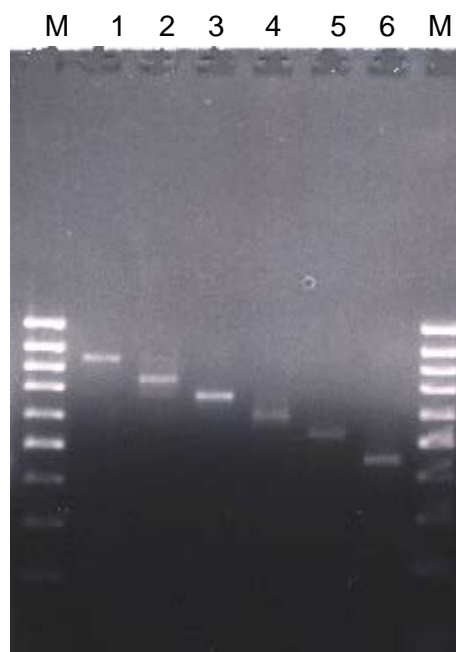
#### 3.2.2.1. PCR-RFLP

Cuando la muestra de mosto sin clarificar (M1), seleccionada por ser la que mayor biodiversidad mostró mediante el aislamiento en placa, se descongeló, homogeneizó y se trató como se describe en material y métodos, se obtuvieron los resultados que se muestran en la **Figura 3.5**, en donde se observa que al amplificar la región 5,8S-ITS del rDNA se obtuvieron seis productos de amplificación diferentes con tamaños comprendidos entre 475 y 850 pb discriminados mediante electroforesis en gel de agarosa. Cada banda se extrajo del gel y se aisló cuidadosamente usando el kit Gene-Clean II (**Figura 3.6**) para el posterior análisis de los fragmentos de restricción con las distintas enzimas *HinfI* y *HaeIII* (**Figura 3.7 y Tabla 3.3**).





**Figura 3.5.** Productos de amplificación de la región 5,8S-ITS rDNA de la muestra M1 sin aislamiento previo en placa. M: Marcador ( 100bp ladder).



**Figura 3.6.** Fragmentos amplificados una vez purificados (carreras 1-6). M: Marcador (100bp ladder)



**Figura 3.6.** Gel de agarosa con los productos de PCR de la región 5.8S-ITS del rDNA para seis especies diferentes (carreras. 1,4,7,10,13,16). Digestión de los amplificados con *HinfI* (carreras 2,5,8,11,14,17) y con *HaeIII* (carreras 3,6,9,12,15,18). M: Marcador (100bp ladder). 1-3: *S. cerevisiae/pastorianus*; 4-6: *H. uvarum/guilliermondii*, 7-9: *K. thermotolerans*, 10-12: No identificada; 13-15: *C. vinaria*, y 16-18: *C. stellata*.

**Tabla 3.3.** Perfiles moleculares y posible identificación, de la amplificación directa del DNA obtenido de la muestra de mosto M1, mediante PCR (ITS-5,8S)-RFLP.

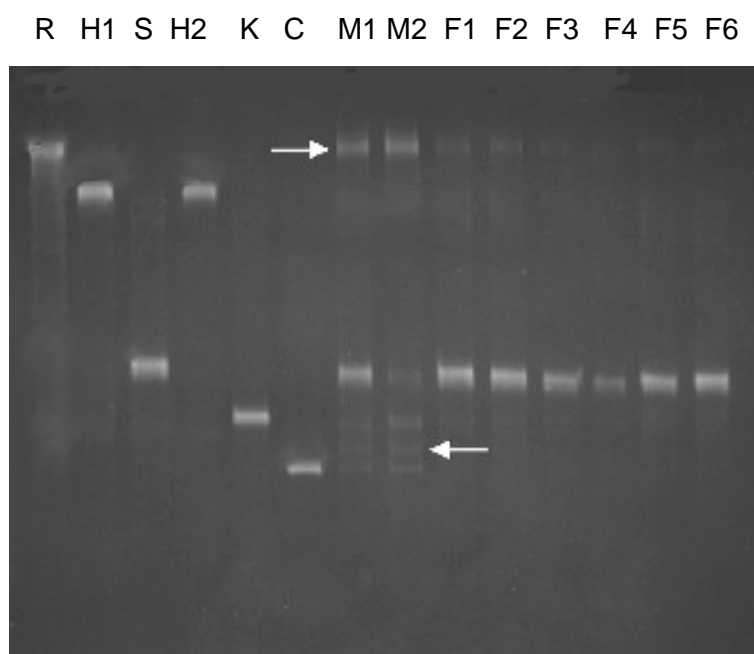
Perfil	Amplificado (pb)	Fragmentos de restricción (pb)		Identificación
		<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	
1	850	320+230+180+150	365+365+155	<i>Saccharomyces cerevisiae/pastorianus</i>
2	750	750	350+200+180	<i>Hanseniaspora uvarum/guilliermondii</i>
3	700	310+215+90+90	355+345	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>
4	650	330+140+85	360+340	No identificada
5	560	460+100	250+200+100	<i>Candida vinaria</i>
6	475	475	235+235	<i>Candida stellata</i>

La identificación de las levaduras se realizó mediante comparación de los perfiles obtenidos con aquellos encontrados por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999). Hay que destacar que de los seis productos de amplificación, cuatro coincidieron con los encontrados, cuando esta técnica se aplicó a los aislados, pero aparecieron dos amplificados más con tamaños de 650 y 560 pb. El amplificado de 560pb correspondía a *C. vinaria*, no aislada en placa y el de 650pb no se pudo asignar a ninguna especie al no coincidir los fragmentos de restricción con los valores recogidos en la bibliografía; podría tratarse de dos individuos distintos con el mismo tamaño de amplificado y diferente perfil de restricción con *HinfI*, ya que si se suma el tamaño de las bandas de restricción se obtiene un tamaño superior al del amplificado.

La amplificación mediante PCR de la región 5,8S-ITS rDNA del DNA extraído cuidadosamente a partir de muestras de mosto-vino puede ser un buen método para identificar las levaduras presentes durante la fermentación de forma rápida, obteniendo información sin necesidad de consumir tiempo con los métodos de aislamiento e identificación de los aislados.

### 3.2.2.2. PCR-TTGE

Al someter al DNA extraído a partir de las 8 muestras de mosto y mosto-vino a la amplificación de la región 18S rDNA, y posteriormente a TTGE, se obtuvieron bandas con distinta movilidad electroforética en los geles de poliacrilamida. En la **Figura 3.8**, se recogen los perfiles PCR-TTGE de las 8 muestras estudiadas: en los 6 primeros carriles se muestran los perfiles PCR-TTGE correspondientes a los cultivos puros de algunas levaduras vínicas, mientras que en los restantes se muestra la evolución del mosto durante la fermentación, desde un mosto sin clarificar (M1), pasando por un mosto clarificado (M2) y las distintas etapas de la fermentación (F1-F6).



**Figura 3.8.** Perfiles TTGE de varios aislados y de las muestras en las diferentes etapas de fermentación. S, H2, K y C son las mismas cepas que en la **Figura 3.3**. R: *Rhodotorula minuta* CECT 10033; H1: *H. uvarum* CECT 11106; M1: mosto sin clarificar; M2: Mosto clarificado; F1-F6: Diferentes etapas de fermentación.

Las muestras correspondientes a los mostos presentaron un mayor número de bandas pero tenues en comparación con la banda asignada a *Saccharomyces*, mientras que M2, presenta una banda poco intensa para esta especie, que podría ser consecuencia del proceso de clarificación que arrastra al fondo del depósito parte de las levaduras en suspensión.

Una vez iniciada la fermentación, las bandas correspondientes a las levaduras no *Saccharomyces* desaparecen progresivamente debido a la dominancia de *Saccharomyces* en el medio de fermentación. Según Cocolin *et al.* (2000a), para la visualización de la banda se necesita una población de levaduras superior a  $10^3$  clas  $\text{mL}^{-1}$ .

De nuevo los géneros de levaduras *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces* y *Candida*, aisladas de forma convencional, se pusieron de manifiesto mediante PCR-TTGE; no obstante, hay que señalar que tanto en mostos, como al inicio de la fermentación, se observó una banda de poca movilidad similar a la obtenida para *Rhodotorula minuta* CECT 10033; esta especie posee además, un tamaño de amplificado de la región 5,8S-ITS rDNA de 660pb (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999), semejante al obtenido para la especie no identificada al aplicar la técnica PCR/RFLP directamente sobre la muestra M1.

En las muestras de mosto se observa una banda con una movilidad que se encuentra entre las correspondientes a *Kluyveromyces* (K) y *Candida* (C), que podría corresponder a *C. vinaria* si tenemos en cuenta los resultados obtenidos mediante PCR-RFLP.

La aplicación de los datos ya disponibles para el estudio de levaduras vínicas por PCR-TTGE (Hernán-Gómez *et al.*, 2000), permite la caracterización genética directa de una fermentación vínica sin previo aislamiento de las cepas, lo que supone una indudable ventaja respecto a la rapidez, y por otra parte este análisis nos ofrece una imagen real de la distribución poblacional del proceso fermentativo, poniendo de

manifiesto la existencia de levaduras no *Saccharomyces* que juegan un importante papel en las primeras etapas del proceso y que podrían ser buenas candidatas para estudiar peculiaridades de interés biotecnológico, o bien detectar aquellas que pudieran causar alteración.



#### **4. MODIFICACIÓN GENÉTICA DE UNA LEVADURA VÍNICA CON EL GEN DETERMINANTE DE LA ENDOPOLIGALACTURONASA (*PGU1*)**





Este capítulo se ha estructurado en tres apartados (A,B y C) para su facilitar su comprensión.

En el primer apartado (A) se estudia la actividad poligalacturonásica de diferentes cepas de *S. cerevisiae*, con el fin de obtener la cepa más adecuada, que actúe como donadora del gen responsable de dicha actividad.

En el segundo apartado (B) se construye una cepa vínica industrial no transgénica, con el gen responsable de la endopoligalacturonasa (*PGU1*) procedente de la cepa UCLMS-39, unido en fusión transcripcional con el promotor del gen *PGK1*.

En el tercer y último apartado (C), se realizan ensayos de microvinificación tanto en mosto blanco como en tinto, con la cepa transformada UCLMS-1M, y con la misma cepa sin transformar, comparándose los resultados obtenidos.



#### 4.A. SELECCIÓN DE UNA CEPA DE LEVADURA *S. cerevisiae* CON ACTIVIDAD POLIGALACTURONÁSICA

##### 4.A1. MATERIAL Y MÉTODOS

##### 4.A1.1. Cepas estudiadas

Se estudiaron un total de 60 cepas de *S. cerevisiae* (UCLMS-1-4, -31, -33, -36, -89) aisladas en nuestro laboratorio de diferentes ecosistemas vínicos (Úbeda, 1995 e Izquierdo, 1997) y cuya correspondencia con la numeración original, aparece recogida en la **Tabla 4.A.1**.

Inicialmente y según el manual de identificación de Kreger-van-Rij, (1984), las cepas UCLMS-33,-37,-54,-55,-59,-74,-75,-78,-84,-85,-86 y -87 se adscribieron a *S. cerevisiae uvarum*, las UCLMS-63 y -64, a *S. cerevisiae chevalieri*, las UCLMS-2,-76 a *S. cerevisiae bayanus* y el resto a *S. cerevisiae cerevisiae*. Mediante la técnica PCR-RFLP (Fernández-Espinar *et al.* 2000), todas ellas se reasignaron a la especie *S. cerevisiae*.

**Tabla 4.A.1.** Correspondencia entre la numeración original (1) y la numeración de la colección UCLMS (2)

(1)	325	377	376	371	301	348	A1	A3	A4	A7	A8	A9	A10	A14	A16	A17	A18
(2)	1	2	3	4	31	33	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
(1)	A19	A20	A21	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B11	B12	B13	B17	B18
(2)	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
(1)	B19	B20	B21	B22	B23	B24	B25	B26	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
(2)	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
(1)	C10	C11	C12	C16	C18	C19	C20	C21	C22								
(2)	81	82	83	84	85	86	87	88	89								

También se utilizó una cepa de laboratorio (*S. cerevisiae*; W3031b) cedida por el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC, Universidad Autónoma de Madrid).

#### **4.A1.2. Ensayo cualitativo de la actividad poligalacturonásica**

La producción de la actividad poligalacturonásica (PG) se estudió en medio sólido utilizando ácido poligalacturónico (APG) (Sigma) como sustrato, a diferentes pHs (8, 5,5 y 3,5) según los medios descritos por Blanco *et al.* (1994), Mc Kay (1988) y Charoenchai *et al.* (1997), aunque en todos los casos y para poder comparar el efecto del pH, se utilizó APG (1%) y glucosa (1%), en lugar de los valores recomendados por los autores.

Con el fin de ensayar la actividad enzimática de forma cualitativa, 5 $\mu$ L de un cultivo joven crecido en YPD, se inocularon en los distintos medios y se incubaron a 30°C durante 3 y 5 días y en donde fue necesario se revelaron siguiendo las recomendaciones de los autores citados. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

#### **4.A1.3. Cuantificación de la actividad PG**

La actividad enzimática se cuantificó utilizando un método útil para la determinación de los ácidos hexurónicos, en presencia de otros azúcares, como las aldosas. La medida de los azúcares reductores se ensayó usando una modificación del método de Nelson (Milner y Avignad, 1967); se realizó una recta de calibrado empleando ácido galacturónico (AGAL) (Sigma) como estándar (0,5mL con 0,02-0,5  $\mu$ mol de AGAL).

Las levaduras se crecieron en medio YNB (0,67%) glucosa (1%) durante 3 días sin agitación a 30°C (Mc Kay, 1990). Después de centrifugar el cultivo (2260 g, 5 min/

4°C), la actividad se determinó incubando 100  $\mu$ L de sobrenadante a 37°C durante 24h, en una mezcla de reacción cuyo volumen final era de 0,5mL, con APG al 0,1% y tampón acetato sódico pH 5,5 (50mM). Como blanco se utilizó la misma mezcla de reacción a tiempo cero y parando la reacción con el reactivo A, descrito por Milner y Avignad (1967).

Los resultados se expresaron en  $\mu$ mol AGAL liberados por mL de sobrenadante ( $\mu$ molAGAL mL<sup>-1</sup>).

#### **4.A1.4. Degradación del ácido poligalacturónico o de la pectina durante el crecimiento de la levadura**

Las levaduras se crecieron en YNB (0,67%), glucosa (1%) y APG o pectina, (0,5%) en tampón acetato 50mM pH 5,5 a 30°C sin agitación durante 3 días. Los cultivos se centrifugaron para eliminar las células, haciendo el ensayo directamente sobre 100 $\mu$ L de sobrenadante.

La capacidad de las cepas de levadura para crecer utilizando AGAL (0,5%) como única fuente de carbono se ensayó en medio YNB (0,67%). Antes de la incubación, los cultivos se mantuvieron en medio líquido YNB (0,67%) durante 6 h a 30°C para agotar las reservas endógenas de azúcares (Ciani y Picciotti, 1995). El crecimiento se evaluó visualmente por la aparición de turbidez, a las 24, 48 y 72 horas, y como control positivo se utilizó YNB-glucosa (0,5%), inoculado con la cepa a estudiar.

#### **4.A1.5. Propiedades de la actividad PG**

La estabilidad de la actividad enzimática de la cepa que mostró los mejores resultados se estudió, a distintos pH (3, 4, 5, 6 y 7) a 37°C y temperaturas (10, 20, 30, 40, 50, 60 °C) a pH 5,5.

Por otra parte para conocer si dicha actividad se vería afectada durante la vinificación, se ensayaron algunos parámetros enológicos como la glucosa (1, 5, 10, 15 y 20%), el SO<sub>2</sub> (50 ppm), el etanol (4, 8, y 12%), el ácido acético (0,1%) y el glicerol (0,5%), que se adicionaron a la mezcla de reacción.

Para comprobar si existían diferencias significativas entre la actividad enzimática a diferentes pH, temperaturas, y parámetros enológicos, se aplicó a los datos el ANOVA de un factor (comparación múltiple DMS), utilizando el programa estadístico SPSS (versión 11).

## 4.A2. RESULTADOS

### 4.A2.1. Ensayo cualitativo

En la **Tabla 4.A.2**, se muestran los resultados de los ensayos cualitativos en placa, utilizando APG como sustrato a pHs 3,5, 5,5 y 8.

De las 61 cepas de *S. cerevisiae*, 25 no hidrolizaron el APG en ninguno de los medios probados y el resto lo hidrolizaron con distinta intensidad y dependiendo del pH.

De las 9 cepas que hidrolizaron el APG a los 3 pHs estudiados (UCLMS-39, -41, -46, -48, -65, -81, -82, -85, -89), cuatro de ellas (UCLMS-39, -81, -85 y -89) lo hicieron con gran intensidad. Las cepas UCLMS-36, -44, -53, -60, -64, -66, -71, -78 sólo mostraron actividad a pH 3,5 y 5,5; en cambio las UCLMS -54, -79 y -83 lo hicieron a pH 5,5 y 8 y la UCLMS-2 muy débilmente a los pH extremos y no a pH 5,5.

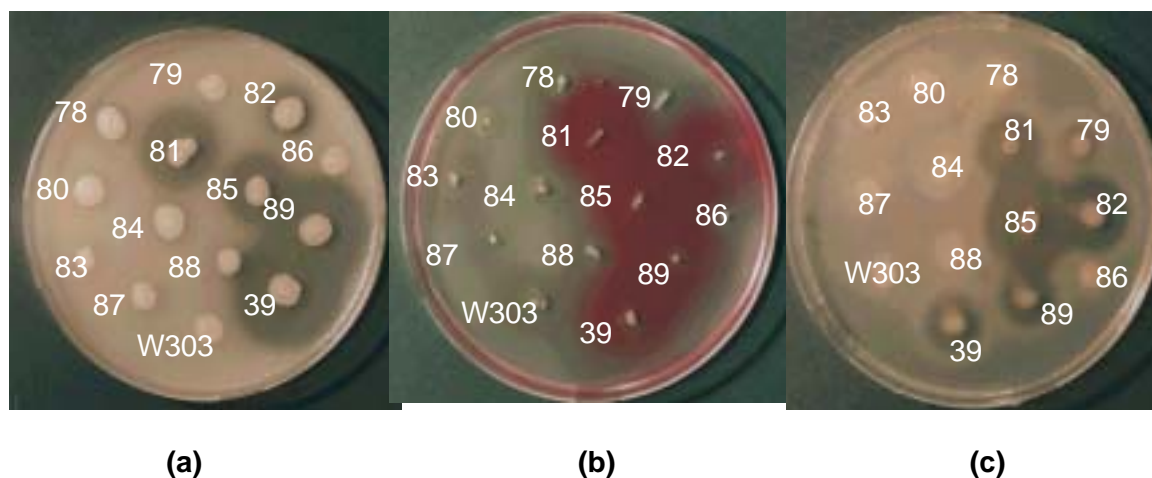
Algunas cepas sólo mostraron halos de hidrólisis a un único pH como la UCLMS-40 a pH 3,5, las UCLMS-37, -38, -45, -50, -62, -68, -73, -75 y -86 a pH 5,5 y las UCLMS-42, -52, -56, -69 y -70 a pH 8.

El pH más efectivo para evaluar ésta actividad en medio sólido fue pH 5,5.

**Tabla 4.A.2.** Grado de hidrólisis del APG de las cepas estudiadas a diferentes pH en medio sólido.

pH	Halos grandes	Halos medianos	Halos pequeños
3,5	39, 48, 53, 81, 85, 89	36, 44, 46, 60, 65, 71, 82	2, 40, 41, 64, 66, 78
5,5	39, 48, 53, 81, 82, 85, 89	36, 64, 65, 66, 71, 75, 83	37, 38, 41, 44, 45, 46, 50, 54, 60, 62, 68, 73, 78, 79, 86
8	39, 81, 82, 85, 89	48, 52, 54, 65	2, 41, 42, 46, 56, 69, 70, 83, 79

En la **Figura 4.A.1.** se muestran los halos de hidrólisis de algunas de las cepas estudiadas a diferentes pHs.



**Figura 4.A.1.** Detección de la actividad PG de los aislados W3031b, UCLMS-39 y 78-89 en medio sólido, tras la incubación a 30°C / 5 días. a) pH 3,5, b) pH 5,5 y tinción con rojo de rutenio (0,1%), c) pH 8 revelado con HCl 6N.

#### 4.A2.2. Cuantificación de la actividad poligalacturonásica

Se cuantificó el AG liberado a partir del APG, utilizando los sobrenadantes de las cepas UCLMS-39,-41,-48,-53, -65, -81, -82, -85 y -89, con distinta capacidad hidrolítica. También se ensayaron cepas que no mostraron actividad en medio sólido a ningún pH como la cepa de laboratorio (W3031b) y UCLMS-43,-63,-1,-31, y -33, las tres últimas susceptibles de ser modificadas genéticamente debido a sus buenas cualidades enológicas (Úbeda, 1995; Úbeda y Briones, 2000).

Ninguna de estas levaduras fue capaz de crecer en presencia de AGAL como única fuente de carbono, resultados en concordancia a los obtenidos por Mc Kay (1990); aunque según Gainvors y Belarbi (1995), algunas cepas de *S. cerevisiae* utilizan las pectinas como fuente de carbono sólo en presencia de fuentes no fermentables como el etanol, el glicerol o el lactato.



En la **Tabla 4.A.3**, se recogen los resultados expresados como % de actividad respecto a la máxima obtenidos para las cepas ensayadas en YNB-glucosa y en YNB-glucosa-AGAL.

Cuando las cepas se crecieron en YNB-glucosa y el sobrenadante se incubó a 37°C/24h en medio APG, la cepa UCLMS-39 mostró la máxima actividad (100%), correspondiente a 3,3  $\mu\text{molAGAL mL}^{-1}$ , seguida de la UCLMS-53 (70,3%) y UCLMS-81 (37,8%), mientras que el resto de cepas mostraron una actividad muy limitada, reduciéndose la cantidad de AG liberado en al menos un 80%.

Cuando las levaduras se crecieron en YNB-glucosa-APG, y se cuantificó el AG liberado directamente en el sobrenadante, hubo un comportamiento diferente, obteniendo el máximo valor (3,8  $\mu\text{molAGAL mL}^{-1}$ ) para la cepa UCLMS-81 (100%), seguida por la UCLMS-85 (89,7%), UCLMS-48 (83,1%), UCLMS-39 (80,9%), UCLMS-82 (65,6%) y finalmente por la UCLMS-53 (50,0%). La cepa UCLMS-89 mostró la actividad más baja en ambos medios de cultivo, a pesar de que presentaba un gran halo de hidrólisis en medio sólido.

Con el fin de conocer si existían diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre las cepas, cuando se crecían o no en presencia de APG, se aplicó el ANOVA de un factor encontrando cepas significativamente distintas respecto a su comportamiento hidrolítico.

Comparando los valores absolutos sin APG o con APG, las cepas UCLMS-48, -81, -82, -85 y -89, mostraron un incremento significativo, cuando se crecieron en presencia de APG, por lo que los galacturonatos podrían inducir la actividad como previamente describió Blanco *et al.* (1999).

Gognies *et al.* (2001), mostraron que las pectinas inducían la expresión de la endoPG vía ácido digalacturónico más que vía AG. En presencia de AG la enzima no era requerida, y la actividad se reducía. Esta regulación fue más evidente en

condiciones respiratorias, debido al hecho de que las levaduras utilizan las pectinas como fuente de carbono sólo en la ruta oxidativa.

En cambio, las cepas UCLMS-39 y -53 se comportaron de forma diferente ya que no fue necesaria la adición de APG en el medio de cultivo para incrementar la actividad y por el contrario se reprimió ligeramente con respecto al primer ensayo, por lo que podrían expresar la actividad PG de forma constitutiva y no inducida.

Como era de esperar, las cepas que no hidrolizaron el APG en medio sólido, tampoco lo hicieron en medio líquido.

**Tabla 4.A.3.** Actividad enzimática relativa (AR) respecto al máximo, crecidas en ausencia (1) o en presencia (2) de APG de diferentes cepas de *S. cerevisiae*.

Cepa	AR (%) (1)	AR (%) (2)
UCLMSC-1	0,1	nd
UCLMS-31	0,3	nd
UCLMS-33	4,5	nd
UCLMS-39*	100	80,9
UCLMS-41	1,6	nd
UCLMS-43	1,7	nd
UCLMS-48*	17,6	83,1
UCLMS-53*	70,3	50,3
UCLMS-63	0,1	nd
UCLMS-65	1,2	nd
UCLMS-81*	37,8	100
UCLMS-82*	7,1	65,6
UCLMS-85*	14,0	89,7
UCLMS-89*	2,9	29,0
W3031b	2,0	nd

\*Existieron diferencias significativas en el medio (1) y (2), para la misma cepa.  
nd. No detectada

#### 4.A2.3. Propiedades de la actividad enzimática de la cepa UCLMS-39

La cepa UCLMS-39, mostró la hidrólisis más completa del APG en todos los medios y pHs ensayados, y por ello se seleccionó para realizar los tests de actividad específicos. Como control negativo, se utilizó la cepa UCLMS-1.

La actividad PG en esta cepa, es constitutiva porque no requiere pectina, APG o AGAL para inducir la síntesis y no estuvo asociada a la célula, ya que cuando se realizó el ensayo sobre las células en lugar del sobrenadante, la actividad se redujo drásticamente, a niveles no detectados con los métodos analíticos utilizados en este estudio.

Cuando la cepa se creció utilizando galactosa (1%) en lugar de glucosa (1%) como única fuente de carbono, la actividad decreció en aproximadamente un 25%; en la bibliografía se recogen resultados dispares, en los que hay cepas que no hidrolizan el APG en presencia de galactosa, otras que muestran una elevada hidrólisis y algunos que no modifican su comportamiento (Mc Kay, 1990, Blanco *et al.*, 1997).

En agitación la actividad decreció en torno al 19%, resultados concordantes con los obtenidos por Mc Kay, (1990) y Blanco *et al.* (1997), quienes no encontraron apenas diferencias con respecto a un cultivo estático, sin embargo en condiciones de gran aireación la actividad se reprimía completamente (Blanco *et al.*, 1997).

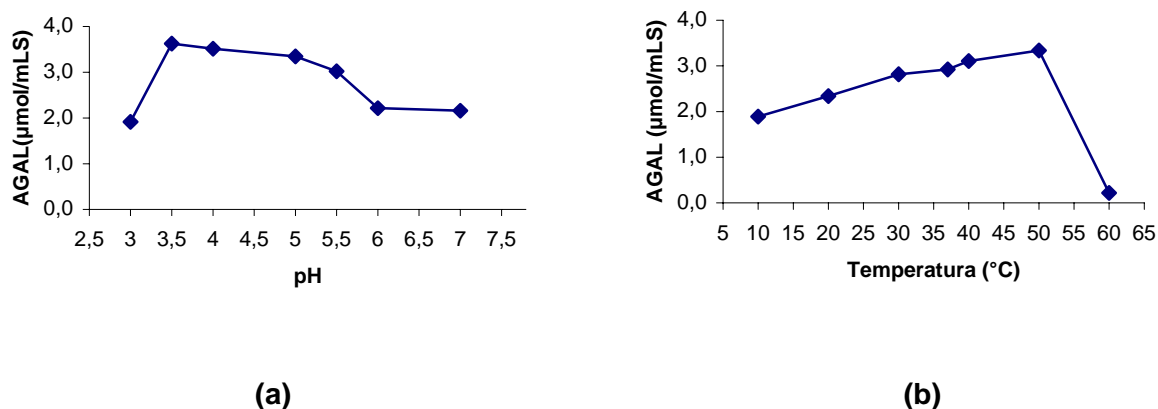
En la **Figura 4.A.2.** se representa la actividad a distintos pH (a) y temperaturas (b). La máxima actividad de la cepa UCLMYS-39 se obtuvo a pH 3,5, aunque el ANOVA de un factor (DMS) ( $p \leq 0,05$ ) no encontró diferencias significativas en el rango comprendido entre pH 3,5 y 5,5. Sin embargo, sí se observaron para el resto de los pH estudiados (3,6 y 7). A pH 3, la actividad se redujo en torno al 50% con respecto al valor máximo.

La temperatura óptima se obtuvo a 50°C, existiendo diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con el resto de temperaturas estudiadas. Por debajo de 50°C la actividad decreció gradualmente, y a 60°C se produjo una rápida disminución.

A 20-30 °C (temperatura usual de fermentación del mosto de uva), la actividad se encontró en torno al 68-80% de la máxima.

Las pectinasas de levaduras descritas por otros autores, muestran también un pH óptimo en la región ácida, entre 3,5 y 5,5 y su temperatura óptima entre 40 y 55°C

(Blanco *et al.*, 1999), excepto para la endoPG de *S. cerevisiae* (Gainvors *et al.*, 2000) y *Cryptococcus albidus* (Federici, 1985), con una temperatura óptima de 25 y 37°C respectivamente.



**Figura 4.A.2.** Actividad enzimática de la cepa UCLMS-39 a diferentes pH (a) y temperaturas (b).

Se estudió además la influencia de diferentes inhibidores potenciales de la poligalacturonasa presentes durante el proceso de vinificación (**Tabla 4.A.4**).

La actividad de la cepa *S. cerevisiae* UCLMS-39 se redujo gradualmente al aumentar la cantidad de etanol, resultados coincidentes con los obtenidos por Takajanagi *et al.* (2001). Éste es un indicador de que la enzima podría preferir el agua en lugar del etanol como aceptor de los residuos de AGAL durante la catálisis del APG. Los otros compuestos como la glucosa,  $\text{SO}_2$ , ácido acético y glicerol no tuvieron un efecto inhibitor ni activador significativo en la actividad; sin embargo otros autores han puesto de manifiesto que la glucosa (Blanco *et al.*, 1994, 1997) y el  $\text{SO}_2$  (Takayanagi *et al.*, 2001) inhibe la actividad de la enzima.

Los resultados obtenidos sugieren que la cepa UCLMS-39 podría hidrolizar las pectinas del mosto en condiciones de vinificación, y que una sobreexpresión del gen o genes implicados sería una buena estrategia biotecnológica

**Tabla 4.A.4.** Efecto de distintos parámetros enológicos sobre la actividad enzimática de la cepa *S. cerevisiae* UCLMS-39.

Parametro	%AR
<sup>a</sup> Control	100,0
<sup>a</sup> Glucosa 20%	100,1
<sup>a</sup> Glucosa 15%	101,8
<sup>a</sup> Glucosa 10%	101,4
<sup>a</sup> Glucosa 5%	97,6
<sup>a</sup> Glucosa 1%	100,2
<sup>b</sup> Etanol 12°	52,7
<sup>b</sup> Etanol 8°	59,9
<sup>c</sup> Etanol 4°	70,7
<sup>a</sup> Acetico 0,1%	98,1
<sup>a</sup> Glicerol 0,5%	95,3
<sup>a</sup> SO <sub>2</sub> 50 ppm	104,6

Distintas letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los diferentes parámetros estudiados.

%AR. Porcentaje de actividad respecto al control.



## 4.B. CONSTRUCCIÓN DE UNA CEPA DE *S. cerevisiae* VÍNICA UCLMS-1 CON ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA.

### 4.B1. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 4.B1.1. Bacterias, levaduras, plásmidos y medios de cultivo

Las bacterias, levaduras y plásmidos utilizados en este estudio se encuentran recogidos en la **Tabla 4.B.1**.

Las células de *E. coli* DH5 $\alpha$  se usaron como hospedadoras para el mantenimiento y la propagación de los plásmidos. Se crecieron en medio Luria-Bertani (LB) (bactotripton 1%, extracto de levadura 0,5% y NaCl 0,5%), suplementado de ampicilina (100 $\mu$ g/L) o tetracicilina (25 $\mu$ g/L) cuando fue necesario.

Las levaduras se crecieron en medio YPD o en medio mínimo SD (0,67% YNB-sin aminoácidos, 2% de glucosa). Los aminoácidos (leucina, histidina y triptófano) y las bases nitrogenadas (adenina y uracilo) se emplearon para suplir las auxotrofías de la cepa W3031b, la selección Ura<sup>+</sup> se llevó a cabo en medio SD sin uracilo.

El sulfometuronmetil (SMM) a 15mg/L se utilizó como marcador de selección de la cepa de levadura vínica transformada.

Los medios sólidos se adicionaron de 2% de agar.

Para estudiar la actividad PG de los transformantes de levadura obtenidos, se realizó réplica en placa en el medio descrito por Blanco *et al.* (1994), y en algunos casos en el de Charoenchai, *et al.* (1997). La cepa de laboratorio W3031b, se creció en YNB sin aminoácidos y los suplementos necesarios para suplir las auxotrofías.

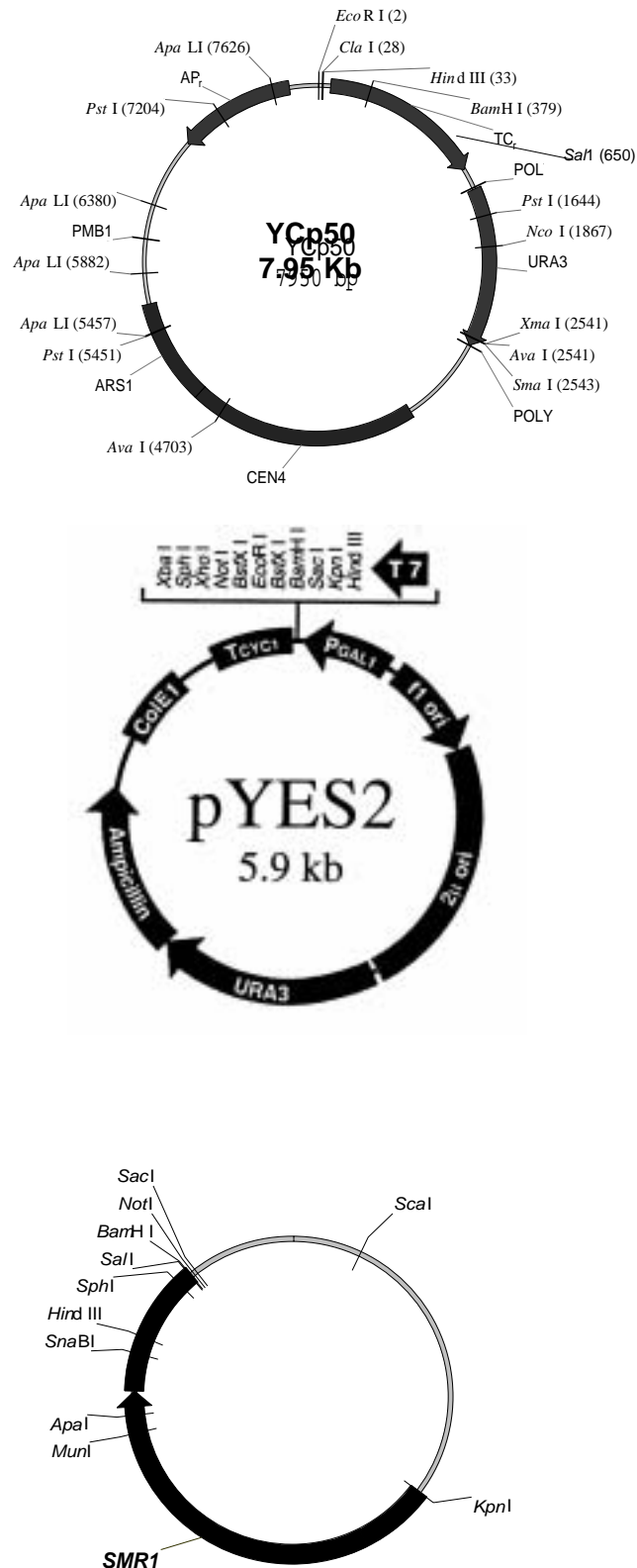
Tabla 4.B.1. Cepas microbianas y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepas y plásmidos	Características relevantes	Citas
<b>Bacterias</b> <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>endA1 hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>) sup E44 thi1<math>\lambda</math><sup>-</sup> recA1 gyr A, rel A1 <math>\Delta</math> (lacZY A-argF) U169 (<math>\phi</math>80/lacZ<math>\Delta</math> M15)</i>	Gibco-BRL
<b>Levaduras</b> <i>S. cerevisiae</i> W3031b	<i>Mat<math>\alpha</math>, ade2-1, his3-11,15 leu2-3,112 ura3-1 trp1-1 can1-100</i>	CBMSO, UAM-CSIC
<i>S. cerevisiae</i> S288C	<i>MAT<math>\alpha</math>, SUC2 mal mel gal2 CUP1 flo1 flo8-1.</i>	Universidad de Milán
<i>S. cerevisiae</i> WYU1, 2 y 3	W303 1b con la construcción YCp50+DNA UCLMS-39, PG+	Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i> WGUa/b	W303 1b con la construcción pYES2+PGU1.	Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i> WKU	W303 1b con la construcción YCp50+pPGK1-PGU1	Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i> UCLMS-39	Cepa silvestre aislada de un ecosistema vínico, donadora del gen <i>PGU1</i>	Izquierdo, (1996)
<i>S. cerevisiae</i> UCLMS-1	Cepa silvestre aislada de un ecosistema vínico, receptora del gen <i>PGU1</i>	Úbeda, (1995)
<i>S. cerevisiae</i> UCLMS-1M	UCLMS-1 transformada con la construcción pPGK1-PGU1-SMR1-410	Este trabajo
<b>Plásmidos</b> YCp50	<i>HindIII - BamHI - SphI - URA3 - CEN4 - ARS1 - pMB1 ori - bla.</i>	CBMSO, UAM-CSIC
YU1,2 y 3	YCp50 con DNA UCLMS-39	Este trabajo
YKU	YCp50 con el inserto pPGK1-PGU1	Este trabajo
pYES 2	2 $\mu$ m, URA3, P GAL1 - T CYC1	Invitrogen
pGUa/b	pYES 2 con <i>PGU1</i>	Este trabajo
pWX509	SMR1-410, pbluescript	Casey <i>et al.</i> (1988)
pKUSa/b	pWX509 con el inserto pPGK1-PGU1	Este trabajo

K, promotor PGK1; U, *PGU1*; G, promotor GAL1; S, marcador SMR1; a/b relacionado con la orientación del cassette con respecto al plásmido.

En la Figura 4.B.1. se recogen los plásmidos pYES2, YCp50 y pWX509, utilizados en este trabajo.





**Figura 4.B.1.** Plásmidos (YCp50, pYES2 y pWX509) utilizados en este trabajo.

#### **4.B1.2. Enzimas y reactivos**

Las enzimas de restricción, *Bam*HI, *Eco*RI, *Sal*I, *Xba*I, *Xho*I, *Sma*I se obtuvieron de Roche y *Sau*3A de Amhersan Life Science. Otras enzimas empleadas en la manipulación de ácidos nucleicos fueron: DNA ligasa del bacteriófago T4, fosfatasa alcalina (Roche), fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Promega), *Pwo* DNA polimerasa (Roche), *Ampli*Taq Gold DNA polimerasa (Applied Biosystems), RNAsa A (Sigma). Los oligonucleótidos utilizados como cebadores se encargaron a TIB molbiol (Roche). Otras enzimas empleadas han sido la lisozima y la proteinasa K, ambas de Sigma. Todas ellas se han utilizado empleando los protocolos descritos (Sambrook *et al.*, 1989) o siguiendo las instrucciones del proveedor.

Los antibióticos ampicilina (Ap) y tetraciclina (Tc) fueron proporcionados por Sigma y el herbicida sulfometuronmetil (SMM) por Supergo.

Los diferentes productos orgánicos e inorgánicos, fueron suministrados por Merck, Panreac, Roche, Bio-Rad, Sigma. Los ingredientes de los medios de cultivo fueron de Difco, Pronadisa, Oxoid y Panreac.

#### **4.B1.3. Electroforesis de DNA**

Los geles de agarosa se prepararon según lo descrito en el apartado 3.1.5. y como marcadores moleculares adicionales a los anteriormente citados, se utilizaron: Marker III (21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125pb) (Roche) y 1Kb ladder (10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250pb) (Biotools).

#### **4.B1.4. Electroforesis de proteínas**

Para la resolución de las diferentes fracciones proteicas extracelulares de *Saccharomyces cerevisiae* excretadas al medio de cultivo, las cepas se crecieron en medio YNB 0,67% y glucosa 1%, durante 3 días sin agitación a 30°C.

Las proteínas del sobrenadante se analizaron utilizando el sistema Mini Protean II (Bio-Rad). Para ello se prepararon geles de poliacrilamida en presencia de SDS, en concreto un gel concentrador al 5% y un gel separador al 10%, así como los tampones necesarios siguiendo las instrucciones de Sambrook *et al.* (1989).

1mL de cultivo en YNB+glucosa se trató con acetona fría, con el fin de precipitar las proteínas, se centrifugó (2260 g, 4°C/5min) y el pellet se resuspendió en tampón Tris-HCl pH 8,5 50mM (Gainvors *et al.*, 1994a), calentando a continuación a 100°C durante 3 minutos, para desnaturalizar las proteínas.

Los geles se tiñeron con una solución azul de Coomassie R-250, destiñéndose posteriormente con una solución decolorante (BioRad). Como marcador de proteínas se utilizó Precision protein standar (BioRad) (250, 150, 100,75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 KDa).

#### **4.B1.5. Manipulación de DNA, clonaje y transformación.**

Las células competentes de *E. coli*, DH5 $\alpha$ , se prepararon siguiendo el método SEM (Simple and efficient method) (Inoue *et al.*, 1990). El estado de competencia de las células se mantuvo durante un tiempo prolongado congelándolas con DMSO al 7% a -70 °C. Para las transformaciones de *E. coli*, se empleó el método descrito por Inoue *et al.* (1990).

El DNA plasmídico de *E. coli* se obtuvo siguiendo el método de minipreparaciones por lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979). Alternativamente, el DNA plasmídico de los clones recombinantes se purificó mediante el Kit Wizard® Plus SV Minipreps de Promega (DNA purification System) y el de los clones a secuenciar se realizó con QIAwell 8 Plasmid Kit (Qiagen).

El DNA genómico de levadura se obtuvo siguiendo el protocolo “Isolation of genomic DNA for Southern Blot Analysis” (Rose *et al.*, 1990) y la recuperación de los plásmidos para la transformación de *E. coli* según Hoffman y Winston (1987).

Las levaduras se transformaron según el protocolo LiAc/SS-DNA/PEG descrito por Gietz y Shiestl (1995).

Para las reacciones de restricción y ligación, se utilizaron los procedimientos estándar (Sambrook *et al.*, 1989).

#### **4.B1.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Todas las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador (Perkin-Elmer model 2400 Thermocycler apparatus), utilizando las enzimas ampli *Taq*Gold DNA polymerase, dATP, dCTP, dTTP, dGTP, 1×*Ampli**Taq* Gold Buffer II y MgCl<sub>2</sub> de Applied Biosystems, o *Pwo* DNA polymerase, PCR buffer 1X (10mM Tris-HCl, 25mM KCl, 5mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2mM MgSO<sub>4</sub>) y dNTPs (nucleotide mix) de Roche, dependiendo del grado de fidelidad necesario en la secuencia a amplificar. La enzima *Pwo* procedente de *Pyrococcus woesei*, es una enzima 5′-3′ DNA polimerasa altamente procesativa y además posee una actividad 3′-5′ exonucleasa conocida como actividad correctora de errores, que incrementa en 10 veces la fidelidad de la síntesis de DNA comparada con la *Taq* DNA polimerasa.

En la **Tabla 4.B.2** aparecen recogidos los oligonucleótidos utilizados.

Tabla 4.B.2 Oligonucleótidos empleados.

Oligonucleótidos	Secuencias	nt
A (NT- <i>PGU1</i> )	5' GAGAGGATCCATGATTTCTGCTAATTCATTACTTATTT 3'	38
B (CT- <i>PGU1</i> )	5'CTGCGGATCCTTAACAGCTTGCACCAGATCCAG 3'	33
C (5'-p <i>PGK1</i> )	5' CCATGGATccctccttcttgaattgatg 3'	28
D (R- <i>PGU1</i> -p <i>PGK1</i> )	5'GTAATGAATTAGCAGAAATCATtgttttatattgttg 3'	38
E (F-p <i>PGK1</i> - <i>PGU1</i> )	5' caaatataaaacaATGATTTCTGCTAATTC 3'	30
F (2 <i>PGU1</i> )	5'GAGACGGTGATTCGGC 3'	16
G (3 <i>PGU1</i> )	5'GAACCGGAATTCACAGC 3'	17

Subrayado. Secuencia de reconocimiento de *Bam*HI y cursiva de *Nco*I  
 Las secuencias representadas en minúscula son complementarias a una parte de la secuencia de la región promotora del gen *PGK1* y en mayúsculas de la región *PGU1*.  
 nt, nucleótido.

El oligonucleótido A es homólogo (nt 11 a 38) a la secuencia de nt de la ORF *PGU1* (nt +1 a +28). Este oligonucleótido posee además en su extremo 5' la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Bam*HI (nt 5 a 10).

El oligonucleótido B es reverso y complementario (nt 1 a 33) a la secuencia de nt de la ORF *PGU1* (nt +1063 a +1086), además posee la secuencia de reconocimiento de la enzima *Bam*HI (nt 5 a 10)

El oligonucleótido C es homólogo (nt 8 a 28) a la secuencia de nt de la región promotora del gen *PGK1* (nt -580 a -560). Este oligonucleótido posee además en su extremo 5' las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *Nco*I (nt 1 a 6) y *Bam*HI (nt 5 a 10) (Yañez *et al.*, 1998)

El oligonucleótido D es reverso y complementario (nt 1 a 22) a la secuencia de nt de la ORF *PGU1* (nt +1 a +22), y reverso y complementario (nt 19 a 38) también a la secuencia de nt de la cadena promotora del gen *PGK1* (nt -16 a +3).

El oligonucleótido E es homólogo (nt 1 a 16) a la secuencia de nt de la región promotora del gen *PGK1* (nt -13 a +3), y homólogo también (nt 13 a 30) a la secuencia de nt de la ORF *PGU1* (nt +1 a +17).

El oligonucleótido F, es homólogo (nt 1 a 16) a la secuencia de nt de la ORF del gen *PGU1* (nt +503 a + 518).

El oligonucleótido G, es reverso y complementario (nt 1 a 17) a la secuencia de la ORF *PGU1* (nt +611 a +626).

#### **4.B1.7. Secuenciación**

La secuenciación de DNA se efectuó con el método enzimático de terminación de cadena por dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977), llevado a cabo por el servicio de secuenciación del CBMSO de la UAM-CSIC.

#### **4.B1.8. Elaboración de una genoteca utilizando el DNA genómico de la cepa *S. cerevisiae* UCLMS-39**

Una vez seleccionada la levadura *S. cerevisiae* con el mayor nivel de expresión de la actividad poligalacturonásica, se utilizó como cepa donadora para la elaboración de una genoteca, con el fin de conocer el gen o genes implicados en dicha actividad.

El DNA, se digirió parcialmente con la enzima *Sau3AI*, obteniendo fragmentos comprendidos entre 3-10 Kb, y se insertaron por ligación en el sitio *Bam*HI del plásmido YCp50, que permite la realización de construcciones en *E. coli* para su posterior estudio en *S. cerevisiae*; contiene secuencias centroméricas, *CEN4*, secuencias de replicación autónoma, *ARS1*, y el gen *URA3* de *S. cerevisiae*, para la estabilidad, el mantenimiento de bajo número de copia (1-3 copias por célula) y la selección de cepas hospedadoras por el genotipo *URA3*.

Con las moléculas de DNA recombinante obtenidas se transformó *E. coli*, seleccionando mediante Ap<sup>R</sup>, obteniendo aproximadamente 20.000 clones de los que

más del 90% fueron Tc<sup>S</sup>. Los transformantes obtenidos en las mismas condiciones de transformación, se agruparon en 42 lotes, de unos 500 cada uno.

Una vez extraído el DNA plasmídico de cada uno de los lotes, dejando crecer unas 6 horas en LB-Ap, para evitar que los plásmidos más pequeños se replicaran con mas frecuencia, se transformó la levadura W3031b, consiguiendo un gran número de transformantes (>10000) seleccionados por el fenotipo Ura<sup>+</sup> y, para la selección del plásmido con el inserto de interés, se realizó una réplica en placa en el medio descrito por Blanco *et al.* (1994).

#### **4.B1.9. Evaluación de la presencia del gen *PGU1* en distintas cepas de *S. cerevisiae* utilizando PCR**

En la bibliografía (Blanco *et al.*, 1998) se encontró que la región codificante del gen *PGU1* (*PGL1* o *PSM 1*) y responsable de la actividad endoPG, tiene un tamaño de 1086 pb y se encuentra asociado al cromosoma X de *S. cerevisiae* S288C (ORF YJR153W).

Por PCR, se detecto la presencia del gen *PGU1* en las distintas cepas citadas en el apartado 4.A1.1, utilizando los oligonucleótidos A y B diseñados en base a la secuencia de nucleótidos de la ORF YJR153W (SGD); las concentraciones fueron (PCRa): 50μL de mezcla de reacción con 1,25 U *AmpliTaq* Gold DNA polimerasa, 1μM de los oligonucleótidos A y B, 0,2 mM de cada dNTP, 1×*AmpliTaq* Gold Buffer II, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> y 5-30 ng DNA, siendo las condiciones de amplificación de 95°C/10min, seguido de 30 ciclos de 95°C/30s, 58°C/30s y 72°C/1min y finalmente 72°C/10min.

Como control positivo se utilizó el DNA de la cepa S288C.

#### 4.B1.10. Construcción pYES 2+PGU1

Para conocer si la actividad de la cepa donante UCLMS-39, era debido al gen *PGU1* y no a otro diferente, se amplificó este gen utilizando como molde el DNA de la levadura UCLMS-39, los oligonucleótidos A y B y la enzima *Pwo* DNA polimerasa.

Para un volumen final de reacción de 50µL las concentraciones de PCRb fueron: PCR buffer 1X; 0,2 mM de cada dNTP; 1,25 U de *Pwo* DNA polimerasa, 1µM de los oligonucleótidos A y B y 5-30 ng del DNA genómico. Las condiciones de amplificación fueron de 94°C/4min, seguido de 30 ciclos de 95°C/30s, 58°C/30s y 72°C/1min y finalmente 72°C/10min.

El gen *PGU1*, se insertó en el plásmido pYES2, episómico de alto número de copia y diseñado para la expresión inducida de proteínas recombinantes en *S. cerevisiae*; tiene secuencias promotoras y activadoras corriente arriba del promotor *GAL1* de *S. cerevisiae* de alto nivel de expresión y fuertemente reguladas. El origen de replicación de 2µm y el gen *URA3* de *S. cerevisiae* para el mantenimiento de alto número de copia y selección de cepas hospedadoras por el genotipo *URA3*.

El fragmento obtenido mediante PCR se trató con *Bam*HI, se purificó con GeneClean II, se ligó utilizando T4 DNA ligasa al plásmido pYES2, previamente linealizado con *Bam*HI, transformando a continuación *E. coli* DH5α con el plásmido formado (pGUa/b). Las construcciones se chequearon mediante restricción y PCR.

El DNA plasmídico extraído de los transformantes con la construcción de interés, se usó para transformar *S. cerevisiae* W3031b.



**4.B1.11. Sustitución del promotor del gen *PGU1* por el de *PGK1*.**

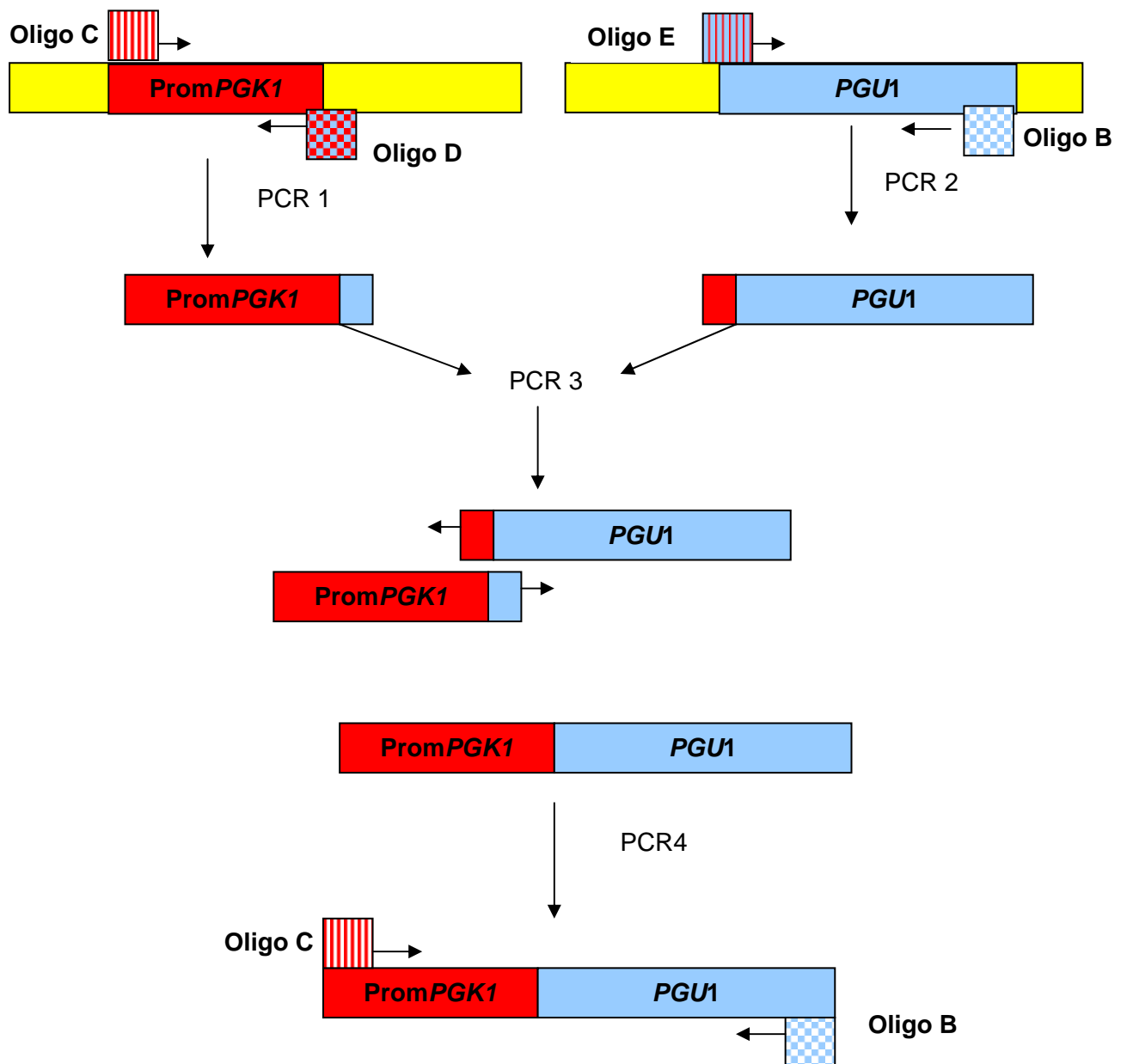
El promotor del gen *PGU1* se sustituyó por el del gen *PGK1* fusionando la zona 5' no codificante del *PGK1* y las regiones codificante y terminadora del gen *PGU1*.

El promotor del gen *PGK1* es de alta expresión constitutiva. Su expresión se incrementa por la presencia de glucosa en el medio y se reprime por otras fuentes de carbono no fermentables como el glicerol (Kingsman *et al.*, 1990). Los datos encontrados en la bibliografía indican que este promotor puede incrementar el nivel de expresión de los genes situados bajo su control; así, las secuencias codificantes de genes como el de la inmunoglobulina (Wood *et al.*, 1985), de la  $\beta$ -1,4-endoxilanasas (Crous *et al.*, 1995), de la  $\alpha$ -amilasa (Yañez *et al.*, 1998), o de la alcohol acetil transferasa (Lilly, *et al.*, 2000) se expresan eficazmente en *S. cerevisiae* cuando están bajo el control de este promotor.

Para ello se empleó la técnica de PCR y los oligonucleótidos B, C, D y E, y en la **Figura 4.B.2.** se muestra el esquema de la fusión.

El volumen de cada reacción (PCR1, PCR2 y PCR4) fue de 50  $\mu$ L con una concentración final de: PCR buffer 1X; 0,2 mM de cada dNTP; 1  $\mu$ M de cada uno de los oligonucleótidos (C y D para la PCR1, B y E para la PCR2 y B y C para PCR4); 1,25 U de *Pwo* DNA polimerasa y 5-15 ng DNA. Las condiciones de amplificación fueron 94°C/4min, seguido de 30 ciclos de 94°C/30s, 55°C/30s y 72°C/30s (PCR1) 1min (PCR2) y 2min (PCR4) y finalmente 72°C/5min.

En cuanto a la reacción de PCR3, las concentraciones y los componentes para un volumen final de 50 $\mu$ L fueron: PCR buffer 1X; 0.2 mM de cada dNTP; 1,25 U de *Pwo* DNA polimerasa y 100 ng de cada uno de los productos de las reacciones de PCR1 y de PCR2. Las condiciones de amplificación (hibridación) fueron 94°C/4min, seguido de 30 ciclos de 94°C/30s, 52°C/1min y 72°C/1,5min y finalmente 72°C/10min.



**Figura 4.B.2.** Esquema de la fusión de la región 5' no codificante del gen *PGK1* y las regiones codificante y terminadora del gen *PGU1*.

El fragmento obtenido mediante PCR3 se trató con *Bam*HI, se purificó con GeneClean II, se ligó utilizando T4 DNA ligasa al plásmido YCp50, previamente linealizado con *Bam*HI, transformando a continuación *E. coli* DH5 $\alpha$  con el plásmido formado (YKU). Las construcciones se chequearon mediante restricción y PCR4.

El DNA plasmídico extraído de los transformantes DH5 $\alpha$  con la construcción de interés, se usó para transformar *S. cerevisiae* W3031b, seleccionando por el fenotipo Ura<sup>+</sup>, y después por PG+.

#### 4.B1.12. Modificación de la levadura UCLMS-1

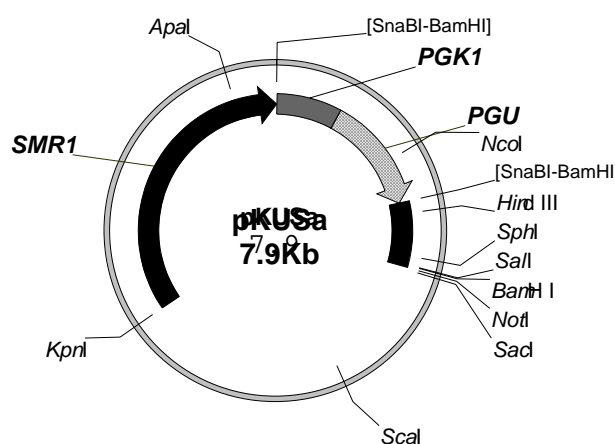
Con el fin de obtener una cepa de levadura vínica con buenas cualidades y capaz de hidrolizar las pectinas durante el proceso de vinificación, se incluyó en el genoma de *S. cerevisiae* UCLMS-1 el gen que codifica para la endopoligalacturonasa (*PGU1*), procedente de la cepa *S. cerevisiae* UCLMS-39, unido en fusión transcripcional al promotor de la fosfoglicerato quinasa (*PGK1*) obtenido de la misma cepa, y descrito en el apartado anterior.

La estrategia seguida fue la integración dirigida al locus *ILV2* (*SMR1*, *THI1*), ORF YMR108W, en el cromosoma XIII, que codifica para la biosíntesis de la enzima acetolactato sintasa (ALS) y que permite la utilización del herbicida sulfometurón metil como marcador de selección (Falco *et al.*, 1985). Este marcador se ha utilizado en la transformación de algunas levaduras industriales (Gasent-Ramírez, *et al.*, 1995, Marin *et al.*, 2001).

Por ello se utilizó el vector integrativo pWX509, al que se le insertó la construcción *pPGK1-PGU1*, obtenida del plásmido YUK, usando el sitio *Bam*HI. Este fragmento se trató con Klenow para obtener extremos no cohesivos, y subclonarse en el sitio *Sna*BI del vector pWX509. A continuación se transformó *E. coli* seleccionando aquellos Ap<sup>R</sup>.

El DNA plasmídico una vez extraído y comprobada que poseían la construcción de interés (pKUSa/b) (**Figura 4.B.3**), se trató con *SalI*, y la levadura vínica se transformó con el fragmento lineal así obtenido, conteniendo la región *SMR1*, el cassette *pPGK1-PGU1*, y las secuencias en los flancos 5' y 3' del locus *SMR1*, seleccionando por resistencia a sulfometuron ( $\text{SMM}^{\text{R}}$ ).

Una vez transformada la levadura, se comprobó que expresaba la actividad poligalacturonásica en medio APG y que contenía el inserto de interés mediante PCR4.



**Figura 4.B.3.** Construcción obtenida por la inserción del cassette *pPGK1-PGU1* en el plásmido pWX509.

## 4.B2. RESULTADOS

### 4.B2.1. Elaboración de una genoteca

Como paso previo necesario a la transformación de una cepa de levadura vínica, con buenas cualidades enológicas, con el gen o genes implicados en la hidrólisis del APG en condiciones de vinificación, se procedió a la elaboración de una genoteca utilizando el DNA de la cepa UCLMS-39.

Con los plásmidos recombinantes de *E. coli* se transformó la cepa de laboratorio W3031b, obteniéndose más de 10.000 transformantes  $\text{Ura}^+$ , pero sólo tres de ellos hidrolizaron el APG de forma estable y con distinta intensidad y por lo tanto poseían el gen implicado en la hidrólisis del APG.

En la **Figura 4.B.4.** se muestra a) un transformante W3031b PG+ y b) los transformantes de la levadura W3031b (WYU2 y WYU3)  $\text{Ura}^+$  y PG+, con el inserto de interés, así como la levadura donadora (UCLMS-39, PG+), y receptora (W3031b, PG-).



(a)

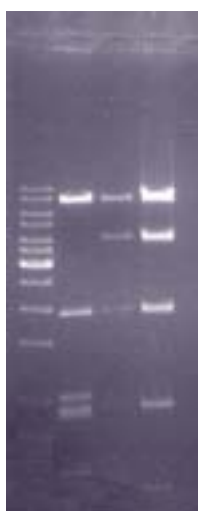
(b)

**Figura 4.B.4.** Halos de hidrólisis en medio APG a pH8, tras la incubación a 30°C/3 días y revelado con HCl 6M. a) Transformante PG+ b) cepas WYU2-3, UCLMS-39 (control+) y W3031b (control-)

Se extrajeron los plásmidos de los tres clones PG+, previamente purificados y se usaron para transformar *E. coli* y *S. cerevisiae*, seleccionando por Ap<sup>R</sup> y Ura<sup>+</sup> respectivamente. En este caso, todas o la mayoría de las levaduras transformadas presentaron el fenotipo PG+.

Los plásmidos recombinates YU1, YU2 e YU3, contenían insertos de 4,7, 7,3 y 7,3 Kb respectivamente, calculados en base a los fragmentos obtenidos por el tratamiento con *Sall*-*EcoRI* (**Figura 4.B.5**).

M YU1 YU2 YU3



**Figura 4.B.5.** Fragmentos de restricción al tratar YU1, YU2 e YU3 con *EcoRI*-*Sall*. M. Marcador (1Kb ladder).

#### 4.B2.2. Evaluación de la presencia del gen *PGU1* en distintas cepas de *S. cerevisiae* utilizando PCR

Debido a que en el año 1998 (Blanco *et al.*, 1998), se publicó la secuencia del gen *PGU1*, responsable de la actividad endopoligalacturonásica (endoPG), se estudió por PCR y utilizando los oligonucleótidos A y B, si los plásmidos YU1, YU2 e YU3 con el inserto conducente al fenotipo PG+ en la cepa W3031b, contenían el gen *PGU1*. Como control positivo se utilizó la cepa S288C.

En los 3 plásmidos se amplificó una banda de tamaño aproximado de 1100pb, y que era el esperado. Debido a la elaboración de una genoteca, se confirmó que los plásmidos YU1,2 y 3, poseían el gen *PGU1*, conducente al fenotipo PG+, y no otro, ya que Blanco *et al.* (1997) sugirieron la existencia en una cepa silvestre de *S. cerevisiae*, de dos genes estructurales (PG1 y PG2) involucrados en la producción de halos de hidrólisis en las placas con ácido poligalacturónico.

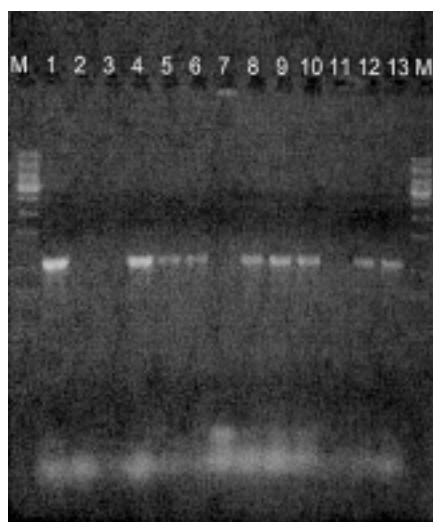
El siguiente paso, fue estudiar sí tanto la cepa donadora UCLMS-39, la receptora de laboratorio W3031b y las levaduras vínicas UCLMS-1,-31 y -33, susceptibles de ser modificadas genéticamente debido a sus buenas cualidades enológicas, poseían también este gen *PGU1*, independientemente de su fenotipo, encontrando que las cepas de *S. cerevisiae* UCLMS-31 y UCLMS-1 no mostraron ninguna banda.

Por ello, y con el fin de conocer sí el resto de las cepas ensayadas de la **Tabla 4.A.1**, poseían esta ORF, independientemente de su fenotipo, se realizó PCR a todas ellas, encontrando que 9 cepas de las 61 estudiadas, (cerca del 15 %), el gen no pudo ser amplificado. Este hecho pone de manifiesto que el gen *PGU1*, podría no ser típico de *Saccharomyces cerevisiae*, pudiendo usarse como marcador intraespecífico para la caracterización genética de levaduras *Saccharomyces*. Estos resultados están en desacuerdo con los obtenidos por Blanco *et al.* (1998) y Naumov *et al.* (2001), que sugirieron que la región codificante del gen *PGU1* (ORF YJR153W) estaría probablemente presente y conservada en todas las cepas de *Saccharomyces* independientemente de su fenotipo.

De las 52 cepas que mostraron una banda de amplificado de tamaño idéntico al descrito para el gen *PGU1* (1086pb) (**Figura 4.B.6**), según los resultados obtenidos en el apartado 4.A2.1, sólo 36 degradaban el ácido poligalacturónico, y 16 no mostraban halos de hidrólisis a ninguno de los pH estudiados, a pesar de que sí se visualizó una banda de amplificado del tamaño esperado. Estas cepas podrían contener, un

promotor inactivo del gen de la poligalacturonasa, una secuencia no funcional del gen estructural, o podrían expresar modificaciones post-transcripcionales que resultaran en un péptido no activo.

En la **Tabla 4.B.3.** se encuentra representada la ausencia o presencia del gen en las distintas cepas, en negrilla se destacan aquellas que no mostraron actividad en los medios sólidos estudiados.



**Figura 4.B.6.** Presencia del gen *PGU1* (1086pb) en cepas de *Saccharomyces*, mediante PCR. Líneas 1-11, cepas UCLMS-57-69; línea 12, cepa UCLMS-39; línea 13, cepa UCLMS-81; M, Marcador (1Kb ladder)

**Tabla 4.B.3.** Amplificación del gen *PGU1* en las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* estudiadas

Amplificación	Cepas
<b>Positiva</b>	UCLMS-2, - <b>33</b> , 36,-37,-38,-39,-40,-41,-42,- <b>43</b> ,-44,-45,-46,- <b>47</b> ,-48,- <b>49</b> ,-50,- <b>51</b> ,-52,-53,-54,- <b>55</b> ,-56,- <b>57</b> ,-60,- <b>61</b> ,-62,-64,-65,-66,-68,-69, -70,-71,-73,- <b>74</b> ,-75,- <b>76</b> ,- <b>77</b> ,-78,-79,- <b>80</b> ,-81,-82,-83,- <b>84</b> ,-85,-86, - <b>87</b> ,- <b>88</b> ,-89 <b>W3031b</b>
<b>Negativa</b>	<b>UCLMS-1,-3,-4, -31, 58,-59,-63,-67,-72</b>

Las cepas en negrilla no mostraron actividad en medio sólido

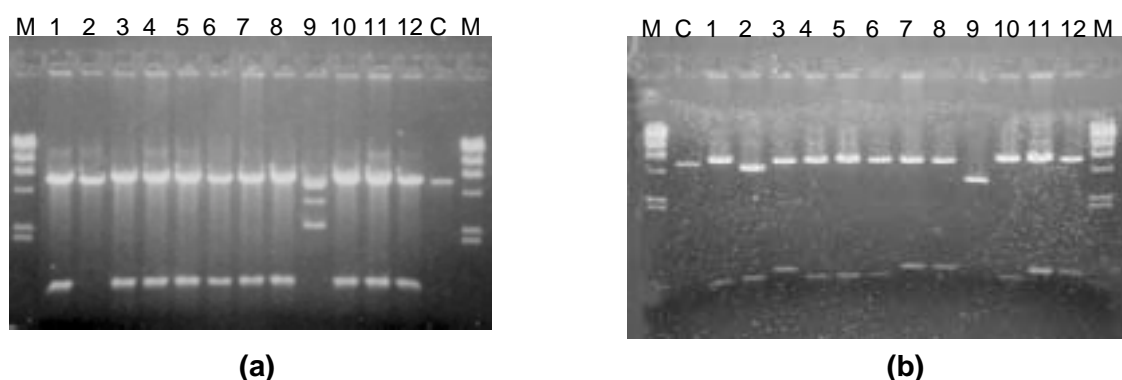


### 4.B2.3. Construcción pYES 2+PGU1

Para confirmar, sí la actividad de la cepa donante UCLMS-39, era debida al gen *PGU1* y no a otro diferente, y una vez sabido que tanto la levadura donante como la receptora de laboratorio lo poseían, se amplificó utilizando como molde el DNA de la levadura UCLMS-39, y los oligonucleótidos A y B diseñados para este fin, y se expresó bajo el promotor *GAL1* del plásmido pYES 2.

Se obtuvieron dos tipos de plásmidos recombinantes, pGUa/b (pYES-*PGU1*), (a) en la misma orientación que el promotor *GAL1* y (b) en sentido contrario. En la **Figura 4.B.7.** se puede observar los plásmidos recombinantes que poseían el inserto de interés (*Bam*HI) (a) y su orientación (*Eco*RI) (b), ya que el fragmento de 1086pb posee una diana *Eco*RI que divide al gen en dos fragmentos de 620 y 466pb.

Los transformantes pGU-2 y -9 no poseían el inserto de interés y en el resto (a) pGU-1,-3,-4,-5,-6,-7,-8,-10,-11 y -12 aparecen dos bandas, una de 5,9Kb correspondientes al plásmido pYES2 y otra de 1086pb correspondiente al gen *PGU1* y respecto a la orientación (b) los pGUa-1,-4,-5,-6 y -10 (6520+466pb) tenían el inserto en la misma orientación que el promotor *GAL1* del vector pYES2 y los pGUb-3,-7,-8,-11 y -12 (6366+620pb) en la contraria.



**Figura 4.B.7.** Digestión de 12 transformantes (carreras 1-12) elegidos al azar con (a) *Bam*HI y (b) *Eco*RI, como control se utilizó el pYES sin inserto (C) y como marcador molecular Marker II (M).

Cuando *S. cerevisiae* W3031b, se transformó con pGU4a y pGU8b, se obtuvieron transformantes Ura<sup>+</sup> con actividad PG<sup>+</sup>, la cuál fue mucho mayor con la construcción pGU4a, incrementándose al utilizar galactosa como fuente de carbono en lugar de glucosa.

#### 4.B2.7. Modificación de la expresión del gen *PGU1*

Una vez conocido que la actividad PG<sup>+</sup> de la cepa UCLMS-39, era debido al gen *PGU1*, que este era funcional bajo su propio promotor y bajo el promotor *GAL1*, y con el fin de incrementar sus niveles de expresión, en condiciones fermentativas, se sustituyó el promotor del gen *PGU1* por el promotor de expresión fuerte del gen *PGK1* (3-fosfoglicerato quinasa) de *S. cerevisiae*.

En la primera mezcla de reacción de PCR que contenía los oligonucleótidos C y D y el DNA genómico de la cepa UCLMS-39, se amplificó un fragmento de DNA que portaba el promotor del gen *PGK1*, nt -580 a +3, en el extremo 5' las secuencias de reconocimiento para las enzimas *NcoI* y *BamHI* y en el extremo 3' una porción correspondiente al principio de la zona codificante del gen *PGU1*, nt +1 a +22 (**Figura 4.B.8a**).

Por otra parte se amplificó en otra mezcla de reacción, que contenía los oligonucleótidos E y B, y el DNA genómico de la levadura UCLMS-39, la zona codificante del gen *PGU1*, nt +1 a +1086, en el extremo 5' una porción de la secuencia correspondiente al promotor del gen *PGK1*, nt -13 a +3, y en el 3' la secuencia de reconocimiento de la enzima *BamHI* (**Figura 4.B.8a**).

En una tercera mezcla de reacción en la que se incluyeron los DNAs purificados correspondientes a los fragmentos que se obtuvieron en las PCR1 y PCR2, se amplificó un nuevo fragmento de DNA que portaba la secuencia del promotor del gen *PGK1*, nt -580 a +3, fusionada a la región codificante del gen *PGU1*, nt +1 a +1086. En la **Figura 4.B.8b**, se observa como se va formando el producto de la fusión

(PCR3) y van desapareciendo los productos de PCR1 y PCR2 al aumentar el número de ciclos.

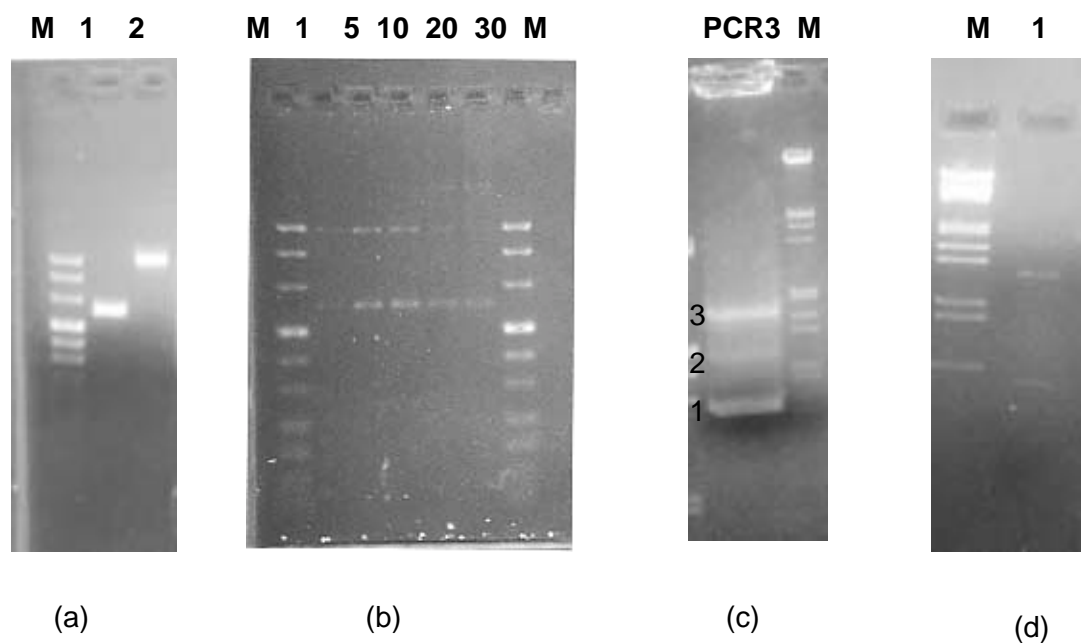
Para conseguir la fusión del promotor del gen *PGK1* y el gen *PGU1*, se modificaron un gran número de factores, como las temperaturas y tiempos de amplificación, la utilización o no de los oligonucleótidos B y E, incluso su adición pasados varios ciclos de amplificación, las cantidades de los productos de PCR1 y PCR2, hasta lograr las condiciones ideales de amplificación, cuyos resultados se muestran en la **Figura 4.B.8c**. El fragmento obtenido mediante PCR3, se chequeó cortando con *EcoRI* (**Figura 4.B.8d**), obteniendo las bandas del tamaño esperado.

Se trató con *Bam*HI, se purificó con GeneClean II y se ligó utilizando T4 DNA ligasa al plásmido YCp50, previamente linealizado con *Bam*HI, transformando a continuación *E. coli* DH5 $\alpha$  con los plásmidos recombinantes.

Mediante restricción (**Figura 4.B.9a y b**) se comprobó que las construcciones tenían el inserto de interés y además se confirmó mediante PCR4, observando un fragmento de 1665pb al emplear los oligonucleótidos complementarios a cada una de los extremos de la fusión, es decir, los oligos A y D (**Figura 4.B.9c**).

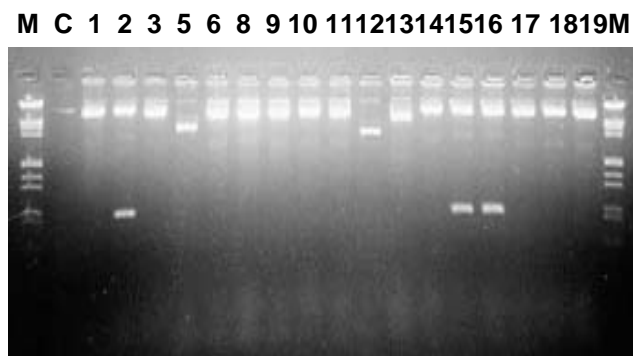
El DNA plasmídico extraído de los transformantes DH5 $\alpha$  con la construcción de interés (YKU-2, -15 y -16), se usó para transformar *S. cerevisiae* W3031b, seleccionando por el fenotipo Ura<sup>+</sup>, y después por PG<sup>+</sup>.

En la **Figura 4.B.10**, se observa el comportamiento del gen *PGU1* bajo los promotores *GAL1* y *PGU1* en el medio descrito por Charoenchai *et al.* (1997) y utilizando distintas fuentes de carbono. Sí observamos los halos de hidrólisis obtenidos, el del promotor *PGK1*, no está influido por la fuente de carbono, sin embargo, el del *GAL1*, se reprime en presencia de glucosa y se activa cuando hay galactosa en el medio.

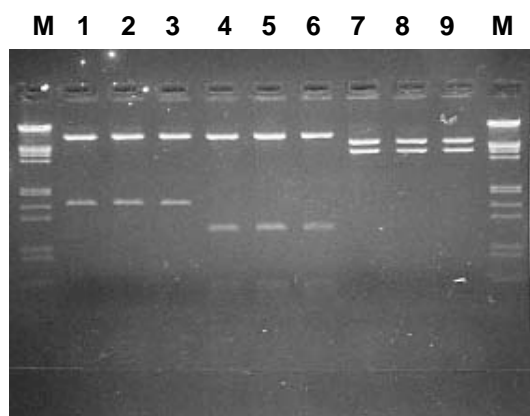


**Figura 4.B.8.** Chequeo de las reacciones involucradas en la sustitución del promotor del gen *PGU1* por el promotor del gen *PGK1*, fusionando la zona 5' no codificante del *PGK1* y las regiones codificante y terminadora del gen *PGU1*.

- a) Chequeo del producto de amplificación de las PCR1 (*pPGK1*) (1) y PCR2 (*PGU1*) (2).
- b) Chequeo de alícuotas tomadas a distintos ciclos de amplificación (1,5,10,20 y 30) en PCR3.
- c) Productos de PCR3. Banda 3, fusión *pPGK1-PGU1* (1665pb), Bandas 1 y 2 restos de los productos de PCR1 y PCR2 sin hibridar
- d) Digestión con *EcoRI* del producto de PCR3, obteniendo dos bandas 1199 y 466pb
- Marcadores (M) utilizados en las distintas figuras fueron: ladder 100pb (a y b) y Marker III (c y d).



(a)



(b)



(c)

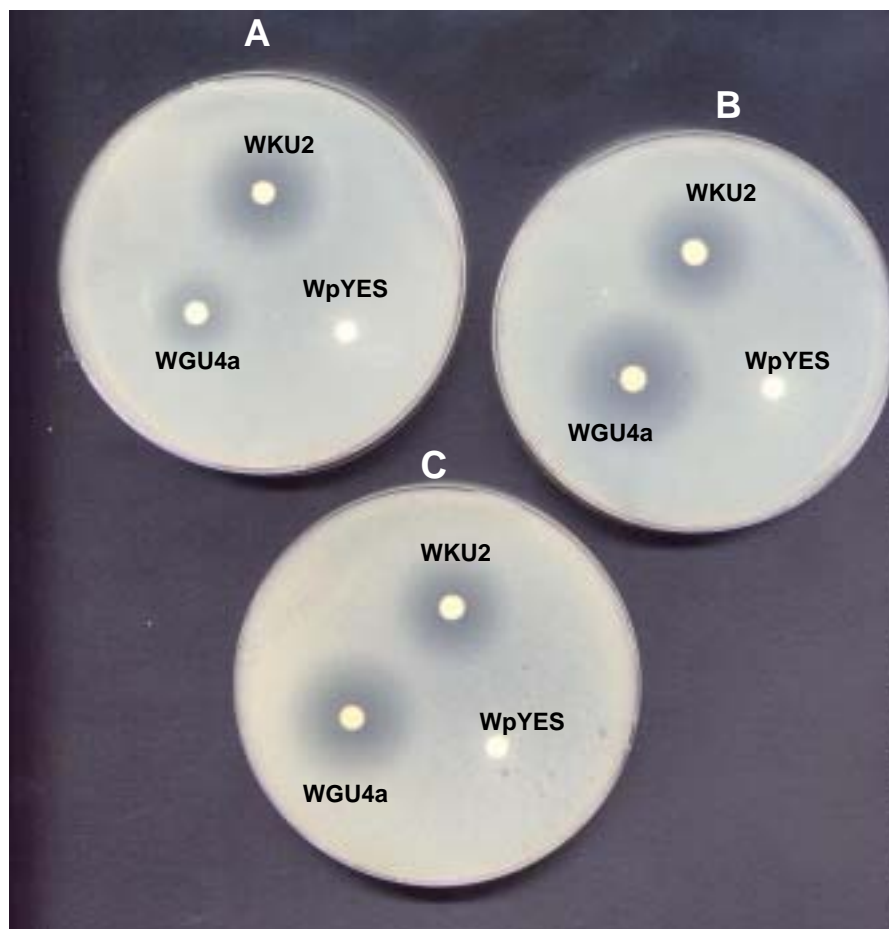
**Figuras 4.B.9.** Chequeo de los transformantes obtenidos YCp50-PCR3.

a) Digestión del DNA plasmídico de varios transformantes DH5 $\alpha$  elegidos al azar con *Bam*HI, sólo tres de ellos poseían el inserto de interés (YKU-2,-15 y -16) C. control YCp50.

b) Digestión de YKU-2,-15 y -16 con *Bam*HI (1,2,3) con *Bam*HI+*Eco*RI (4,5,6) y con *Xho*I+*Sal*I (7,8,9), los tres con la misma orientación

c) Producto de PCR4 utilizando como molde el DNA plasmídico YKU2 (1).

En todos los casos se utilizó el marcador (M) Marker III.



**Figura 4.B.10.** Halos de hidrólisis de los transformantes WYU2, WGU4a y WpYES, en medio APG pH 3,5, en presencia de:

- A) Glucosa (1%)
- B) Glucosa (0,5%) y Galactosa (0,5%)
- C) Galactosa (1%)

#### 4.B2.9. Análisis de la secuencia de *PGU1*

Con objeto de conocer la secuencia de nucleótidos del gen *PGU1* de la cepa UCLMS-39, se utilizó el DNA plasmídico de pGU1b, pGU4a, pGU3b, pYGU8b, (plásmido pYES2 unido al gen *PGU1*) e YKU2, YKU 15 e YKU 16 (plásmido YCp50 con la construcción *pPGK1-PGU1*), así como los oligonucleótidos A, B, F y G, para tener una lectura adecuada en ambas direcciones.

El análisis de la secuencia del gen *PGU1* de la cepa UCLMS-39, confirmó un tamaño de 1086pb y mostró más del 99% de nucleótidos idénticos al de la secuencia publicada para la cepa S288C (correspondiente a ORF YJR153W, localizada en el cromosoma X), IM1-8b (Blanco *et al.*, 1998), X2180-1B (Gognies *et al.*, 1999) y FY1679 (Jia y Wheals, 2000), que codifica una proteína de 361 aminoácidos con peso molecular calculado de 37.287Da y un pI teórico de 8,16, un péptido señal potencial de 18 aminoácidos (1-18), con un sitio activo probable en el residuo 222 (Histidina) y dos sitios potenciales de glicosilación en posiciones 318 y 330.

En la **Tabla 4.B.4**, aparece recogida la secuencia de 361 aminoácidos de la cepa S288C, comparada con la de la UCLMS-39. Únicamente se encontró la mutación de un nucleótido (+877 A→G) que cofiere el cambio de un aminoácido en la secuencia proteínica (Ser<sup>293</sup> →Gly). La secuencia de la cepa UCLMS-39, de 361 aminoácidos tiene un pI teórico de 8,49 y un peso molecular calculado de 37.256Da ([http://us.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html)).

Este cambio en el aminoácido 293, también se ha detectado en las cepas *S. cerevisiae* (SCCP) y *S. cerevisiae uvarum* (Scu), estudiadas por Gognies *et al.* (1999) y Jia y Wheals (2000), respectivamente, siendo ambas secuencias funcionales. Los datos de la endoPG de *A. Niger* (Armand *et al.*, 2000), mostraron que los residuos cruciales en el sitio activo eran (usando la numeración de *S. cerevisiae*), Asn<sup>177</sup>,

Asp<sup>179</sup>, Asp<sup>200</sup>, Asp<sup>201</sup>, His<sup>222</sup>, Gly<sup>223</sup>, Arg<sup>255</sup>, y Lys<sup>257</sup>, y ninguno de estos se encontró alterado en la cepa UCLMS-39.

Gognies et al. (1999), secuenciaron el gen *PGU1*, encontrando que el de la cepa X2180-1B, era idéntico al de la base de datos, mientras que el de la SCCP poseía tres aminoácidos distintos (Val<sup>149</sup> →Ala; Gly<sup>288</sup>→Asp; Ser<sup>293</sup> →Gly). Jia y Wheals (2000), estudiaron 3 cepas, *S. cerevisiae*, FY1679, *S. cerevisiae chevalieri* (*Scs*) y *S. cerevisiae uvarum* (*Scu*) y encontraron que la cepa FY1679 era idéntica a la de la base de datos, la *Scs* con dos aminoácidos distintos (Asp<sup>303</sup> →Val y Ser<sup>304</sup>→Pro) y la *Scu* con 6 (Thr<sup>39</sup>→Ala, Thr<sup>159</sup>→Pro, Asn<sup>220</sup>→Tyr, His<sup>246</sup>→Thy, Ile<sup>279</sup>→Thr y Ser<sup>293</sup> →Gly). Cuando clonaron el gen estructural en el vector de expresión pYES, mostró que la cepa FY1679, contenía una endoPG homóloga no transcrita, pero funcional, razonamiento en concordancia con las conclusiones obtenidas por Blanco et al. (1998) e Hirose et al. (1998) y contrario a lo deducido por Gognies et al. (1999) para la cepa X2180-1B.



**Tabla 4.B.4.** Secuencia de aminoácidos de la endopoligalacturonasa de la cepa S288C (A) y de la UCLMS-39 (B). El aminoácido en negrilla indica la diferencia entre las dos secuencias. En la parte inferior de la tabla aparece recogida la secuencia de nucleótidos donde se encuentra la mutación.

A 1	MISANSLIS TLCAFAIATP LSKRDCTLT GSSLSSLSTV KKCSSIVIKD
B 1	MISANSLIS TLCAFAIATP LSKRDCTLT GSSLSSLSTV KKCSSIVIKD
A 51	LTVPAGQTLT LTGLSSGTTV TFEGTTTFQY KEWSGPLISI SGSKISVVGA
B 51	LTVPAGQTLT LTGLSSGTTV TFEGTTTFQY KEWSGPLISI SGSKISVVGA
A 101	SGHTIDGQGA KWW DGLGDSG KVKPKFVKLA LTGTSKVTGL NIKNAPHQVF
B 101	SGHTIDGQGA KWW DGLGDSG KVKPKFVKLA LTGTSKVTGL NIKNAPHQVF
A 151	SINKCSDLTI SDITIDIRDG DSAGGHNTDG FDVGSSSNVL IQGCTVYNQD
B 151	SINKCSDLTI SDITIDIRDG DSAGGHNTDG FDVGSSSNVL IQGCTVYNQD
A 201	DCIAVNSGST IKFMNNYCYN GHGISVGSVG GRSDNTVNGF WAENNHVINS
B 201	DCIAVNSGST IKFMNNYCYN GHGISVGSVG GRSDNTVNGF WAENNHVINS
A 251	DNGLRIKTVE GATGTVTNVN FISNKISGIK SYGIVIEGDY LN <b>S</b> KTTGTAT
B 251	DNGLRIKTVE GATGTVTNVN FISNKISGIK SYGIVIEGDY LN <b>G</b> KTTGTAT
A 301	GGVPISNLVM KDITGSVNST AKRVKILVKN ATNWQWSGVS ITGGSSYSGC
B 301	GGVPISNLVM KDITGSVNST AKRVKILVKN ATNWQWSGVS ITGGSSYSGC
A 351	SGIPSGSGAS C
B 351	SGIPSGSGAS C
870	TTTGAAT <b>GG</b> TAAGACT
870	TTTGAAT <b>AG</b> TAAGACT

#### 4.B2.10. Construcción de una cepa de *S. cerevisiae* vínica UCLMS-1M con actividad pectinolítica

Se incluyó en el genoma de *S. cerevisiae* UCLMS-1 el gen que codifica para la endopoligalacturonasa (*PGU1*), procedente de la cepa *S. cerevisiae* UCLMS-39, unido en fusión transcripcional al promotor de la fosfoglicerato quinasa (*PGK1*) obtenido de la misma cepa. La cepa UCLMS-1 no poseía el gen *PGU1*, caracterizado mediante PCR.

La cepa de levadura UCLMS-1, se transformó con el fragmento lineal obtenido, mediante el tratamiento del plásmido pKUSa y del pKUSb con *SaI*, obteniéndose 30 transformantes con la construcción KUSa, y 35 con la KUSb, SMM<sup>R</sup>, y de ellos más de la mitad presentaron actividad PG+, estable en medio sólido.

Hay que señalar que la cepa recombinante obtenida no es una cepa transgénica, sino que tan sólo se trata de una levadura modificada genéticamente, ya que la legislación considera que sí el gen o algunas de las secuencias del DNA del cassette introducidas en el organismo receptor proviene de otra especie este organismo genéticamente modificado es un transgénico. Es diferente cuando lo que se hace es un cambio de expresión con un promotor nativo no modificado de un gen procedente de la misma entidad biológica que se está transformando, en este caso es un organismo genéticamente modificado.

En la cepa UCLMS-1M, el cassette expresado es puramente de origen *S. cerevisiae*, promotor y gen. Además de ser un organismo genéticamente modificado, no transgénico, coincide con las reglamentaciones ya que el cassette integrado no contiene ninguna secuencia de fago o bacteria lo que haría que se excluyera totalmente en un futuro para el uso biotecnológico.

Cuando la cepa transformada se creció en placas de APG (Charoenchai *et al.*, 1997) a pH 3,5, los halos de hidrólisis se visualizaron a las 18 h. de incubación, frente a las 48h que necesitó la cepa UCLMS-39.

Se seleccionaron dos transformantes, UCLMS-1Ma, UCLMS-1Mb y se comprobó mediante PCR4 la presencia del fragmento de 1665pb correspondiente a la construcción *pPGK1-PGU1* y la cepa UCLMS-1Ma se seleccionó al azar para los ensayos de cuantificación.

En la **Tabla.4.B.5**, aparecen recogidos los  $\mu\text{molAG}$  liberados por la cepa transformada, la cepa donante y la cepa sin transformar, cuando se cultivaron sin o con APG, en las condiciones descritas en los apartados 4.A1.2 y 4.A1.3.

En todos los casos la cepa UCLMS-1Ma mostró mucha más actividad que la donante UCLMS-39 y en tan sólo 1 h de contacto con el APG liberó una gran cantidad de galacturonatos, que aumentó progresivamente con el tiempo de contacto, además fue capaz de hidrolizar el APG durante el crecimiento tanto a pH 3,5 como a 5,5, e hidrolizó débilmente la pectina, también a ambos pH.

**Tabla. 4.B.5.** Actividad poligalacturonásica de las cepas donadora, receptora y transformada.

	(1) $\mu\text{moles AG mL}^{-1}$			(2) $\mu\text{moles AG mL}^{-1}$			
	1h	5h	24h	APG3,5	APG5,5	PT3,5	PT5,5
UCLMS-39	1,01	2,05	3,26	3,06	2,94	0,38	0,30
UCLMS-1	0,00	0,01	0,02	0,01	0,05	0,00	0,02
UCLMS-1Ma	3,82	5,06	6,26	9,12	7,96	1,47	1,50

(1) Incubación del sobrenadante de la levadura crecida 3 días sin agitación en medio YNB-glucosa, en PGA 37°C pH 5,5 a distintos tiempos (1h, 5h, 24h)

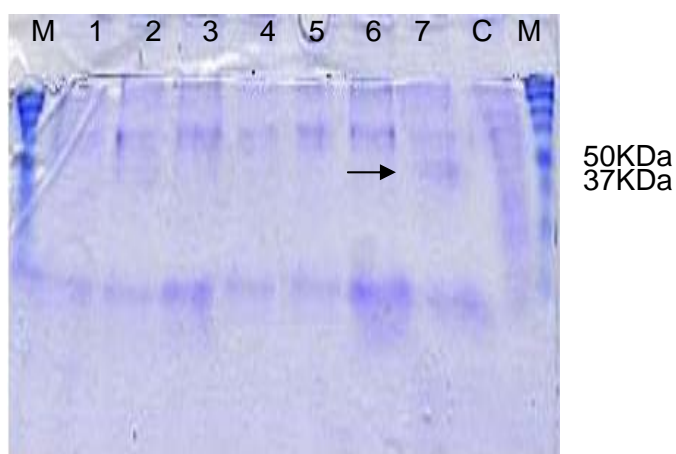
(2) Cuantificación directa del AG liberado directamente en el medio de cultivo durante el crecimiento de la levadura en medio YNB-glucosa-APG o PT al 0,5% a pH3,5 y 5,5.

#### 4.B2.11. Electroforesis de proteínas

En la **Figura 4.B.10**, se muestra un electroforegrama de las proteínas del sobrenadante de las cepas UCLMS-1, -1M,-33,-39,-53,-65, y W3031b, elegidas por su

diferente comportamiento en medio APG y de una poligalacturonasa de *Aspergillus japonicus* (Sigma) que se usó como control positivo. Se aprecia, que la única cepa que tiene una banda diferente de aproximadamente 37,3 KDa, que es el tamaño estimado para la enzima endoPG, comparada con el marcador molecular, es la cepa UCLMS-1M, debido posiblemente a su expresión bajo el promotor del *PGK1*. Para el resto de las cepas no se pudo visualizar la enzima en el sobrenadante.

Respecto al control positivo, se observa que realmente es un cóctel enzimático, ya que se aprecian numerosas bandas, correspondientes a diferentes proteínas con distintos pesos moleculares.



**Figura 4.B.10.** Gel de poliacrilamida, carreras 1-7. UCLMYC-39,-53,-65, W3031b, UCLMS-33,-1,-1M, C. control positivo, M. Marcador proteínas.

## **4.C. MICROVINIFICACIONES CON LA CEPA RECOMBINANTE *S. cerevisiae* UCLMS-1M**

### **4.C1. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **4.C1.1. Ensayos de Microvinificación**

Se llevaron a cabo microvinificaciones por quintuplicado de mosto blanco y tinto siguiendo el procedimiento tradicional para la elaboración de estos vinos. Como cultivos iniciadores se usaron las levaduras *S. cerevisiae* UCLMS-1M y la UCLMS-1, que se empleó como control.

El mosto blanco se obtuvo de uvas de la variedad Airén y el tinto, de uvas de la variedad Cencibel, conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso. Los mostos, se adicionaron de 30ppm de  $\text{SO}_2$  y se utilizaron tanto para la preparación del inóculo como para las microvinificaciones. Estas se llevaron a cabo en matraces de 1L provistos de válvulas Müller y se inocularon con una concentración de  $10^7$  clas/mL (**Figura 4.C.1**)

Las fermentaciones de mosto blanco se realizaron a una temperatura controlada de  $18-20^{\circ}\text{C}$ , hasta agotar azúcares y los mostos tintos a  $24-25^{\circ}\text{C}$ , los cuales se mantuvieron en contacto con los hollejos durante 72 horas, y mediante estrujado manual se obtuvo la máxima cantidad de semifermentado posible. El rendimiento de la extracción de mosto-vino, se calculó por comparación entre el peso inicial de las uvas enteras de partida y el residuo final de hollejos. El semifermentado, ya sin hollejos se dejó a la misma temperatura hasta agotar azúcares.

Los vinos, una vez finalizada la fermentación, se centrifugaron para eliminar las lías (2260g,  $4^{\circ}\text{C}/5\text{min}$ ), y se conservaron en refrigeración hasta su análisis.



(a)



(b)

**Figura 4.C.1.** Matraces en fermentación. Microvinificaciones de mosto blanco (a) y de mosto tinto (b).

#### 4.C1.2. Viabilidad e implantación de los cultivos iniciadores

Se tomaron muestras periódicamente para estimar la viabilidad celular, y se sembraron en superficie en agar Wallenstein (Oxoid). Tras la incubación a 30°C durante 48 horas, se recontaron las colonias obtenidas.

Para conocer la dominancia de la cepa inoculada, se seleccionaron 10 aislados al azar y se sometieron al análisis de restricción del DNA mitocondrial mediante el tratamiento con *Hinf*I, y para confirmar que la cepa UCLMS-1M conservaba la actividad pectinolítica, estos aislados se crecieron en el medio APG a pH 3,5 (Charoenchai *et al.*, 1997)

#### 4.C1.3. Parámetros físico-químicos

A los vinos obtenidos, se les analizaron los parámetros convencionales, como la acidez total (volumetría), la acidez volátil (García Tena), el pH (pHmetro), los azúcares reductores (Rebelein) y el grado alcohólico (ebullometría). Además en los tintos, se midieron las absorbancias a 420nm (amarillo), 520nm (rojo) y 620nm (azul) para determinar la intensidad colorante ( $IC = A_{420} + A_{520} + A_{620}$ ) (Glories, 1984) y la tonalidad ( $T = A_{420}/A_{520}$ ) (Sudraud, 1978).

#### 4.C1.4. Velocidad de filtración

El efecto de la actividad poligalacturonásica de la cepa *S. cerevisiae* UCLMS-1M sobre el tiempo de filtración de los vinos, se midió cronometrando el tiempo necesario para que 100mL de producto final pasaran a través de un filtro de 0,45  $\mu$ m, utilizando un equipo de filtración tangencial (Minitan, Millipore).

#### **4.C1.5. Medida de la viscosidad**

Se midió la viscosidad a 40°C, de 10mL del vino filtrado en un viscosímetro Cannon-Fenske para líquidos transparentes, 5354/2 (Comecta S.A). La viscosidad cinemática (VC), expresada en centistokes (csk), se calculó utilizando la fórmula  $VC=Kt$ , donde  $K_{40^{\circ}C}= 0,0016709$  y t es el tiempo expresado en segundos.

#### **4.C1.6. Volátiles mayoritarios**

Mediante cromatografía de gases (CG) se determinó el contenido en: acetaldehído, metanol, 1-propanol, 2-butanol, isobutanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, y acetato de etilo, empleando 3- pentanol como patrón interno. Como patrón externo se utilizó una muestra con concentraciones conocidas de los compuestos citados, calculando la cantidad de cada uno de ellos, por comparación entre las áreas. Se utilizó un cromatógrafo Perkin Elmer y una columna empaquetada VINICOL (González y González,1994). Las condiciones fueron: Tª del detector: 225 °C; Tª del inyector: 200°C; Gas portador: N<sub>2</sub> ; Flujo: 15 mL/min, volumen de inyección 1µL. Programa del horno; Tª inicial 40°C / 3 min, 6°C / min hasta 60°C, isoterma 16 min y 6°C / min hasta 126°C, isoterma 12 min.

#### **4.C1.7. Análisis sensorial**

Las pruebas se llevaron a cabo por 25 catadores entrenados. Con objeto de conocer si existían diferencias significativas entre los vinos elaborados con la cepa modificada y sin modificar, se realizó una prueba triangular(ISO 4120:1983) para cada tipo de vino. En el caso de encontrar diferencias significativas se diseñaría una prueba de comparación por parejas (ISO 5495:1983) para establecer si había o no una preferencia por alguna de ellas, y evaluar sus atributos.



**4.C1.8. Tratamiento estadístico**

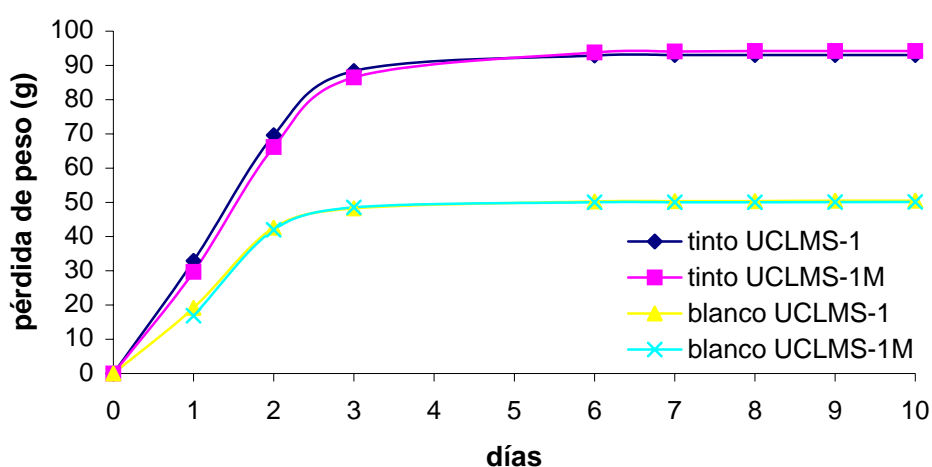
Para comprobar si existían diferencias significativas entre los vinos elaborados con la levadura UCLMS-1 y UCLMS-1M, se aplicó a los datos el test t –student, para muestras relacionadas, utilizando el programa estadístico SPSS (versión 11)



## 4.C2. RESULTADOS

### 4.C2.1. Ensayos de Microvinificación

Para cada tipo de elaboración se observó un comportamiento cinético similar independiente de la cepa de levadura usada (UCLMS-1 o -1M). En la gráfica (**Figura 4.C.2**) no se aprecia el periodo de latencia puesto que los matraces se inocularon con una elevada concentración de células viables.

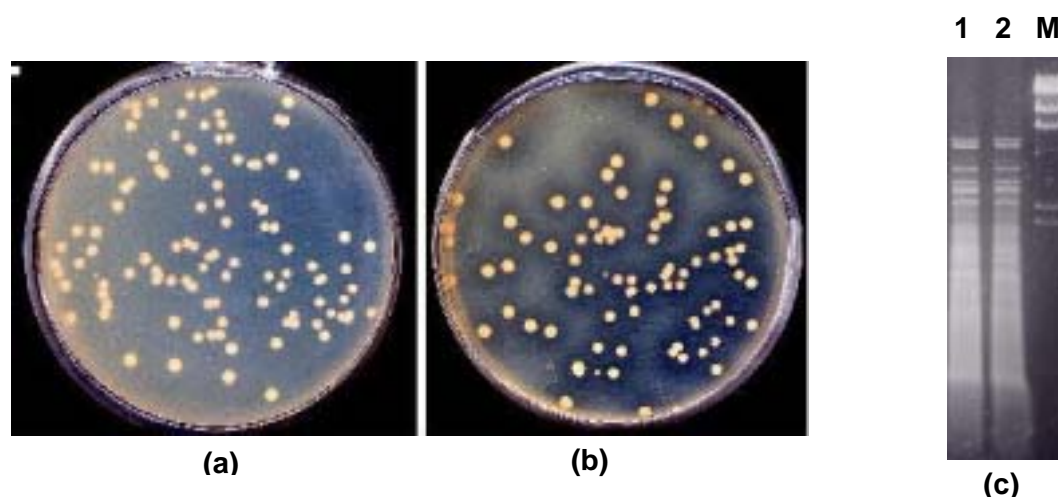


**Figura 4.C.2.** Cinética de fermentación de las microvinificaciones en blanco y en tinto

### 4.C2.2. Viabilidad e implantación de los cultivos inoculados

Las microvinificaciones realizadas con ambas cepas mostraron una adecuada viabilidad celular, obteniéndose recuentos propios en este tipo de procesos.

Respecto a la implantación de los cultivos, todos los aislados analizados presentaron idéntico perfil de restricción del DNA mitocondrial al de los cultivos iniciadores, cuyo patrón se observa en la **Figura 4.C.3**. Como se aprecia en la placa con APG, los aislados procedentes de las microvinificaciones con la cepa UCLMS-1M, mostraron actividad poligalacturonásica.



**Figura 4.C.3.** Desarrollo de halos de hidrólisis en medio APG a pH 3,5 tras 24 h de incubación a 30°C. (a) UCLMS-1 (b) UCLMS-1M  
(c) Perfil del DNA mitocondrial de las cepas UCLMS-1 y -1M (carreras 1 y 2). M. Marcador (Marker II).

#### 4.C2.3. Parámetros físico-químicos

Los resultados de los parámetros fisicoquímicos para los vinos blancos y tintos se encuentran recogidos en la **Tabla 4.C.1**. Cuando se aplicó el test t-student para muestras relacionadas, se observó que para los vinos blancos no existieron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para ninguno de los parámetros fisico-químicos estudiados. Sin embargo, para los vinos tintos elaborados con la UCLMS-1M (TM) la cantidad de azúcares reductores, fue significativamente superior ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al control (TC). Estos resultados son lógicos, teniendo en cuenta que la maceración con este tipo de enzimas da lugar a la hidrólisis lenta de las paredes celulares de los hollejos, aumentando el contenido de polisacáridos pécticos enzima-resistentes como el RG-II, que pueden incrementar el poder reductor (Pellerin, 2001).

Además el TM tuvo mayor intensidad colorante, y tonalidad roja ( $A_{520nm}$ ), sin embargo, el TC presentó, mayor tonalidad, resultados concordantes a los obtenidos por González San José *et al.* (1998) cuando estudió el efecto del tratamiento con enzimas pectinolíticas comerciales.

**Tabla 4.C.1.** Parámetros físico-químicos para los distintos tipos de vinos elaborados.

	BC		BM		TC		TM	
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE
pH	3,84	0,02	3,84	0,03	4,15	0,05	4,14	0,04
Acidez volátil (g/L A. acético)	0,10	0,01	0,11	0,00	0,10	0,02	0,10	0,01
Acidez total (g/L A. tartárico)	5,10	0,09	5,00	0,09	4,34	0,16	4,45	0,18
Azúcares reductores (g/L)	0,53	0,25	0,57	0,06	*2,85	0,31	*4,67	0,21
Grado alcohólico (%v/v)	12,3	0,0	12,3	0,0	15,2	0,1	15,3	0,1
A420	0,118	0,001	0,131	0,007	0,384	0,039	0,455	0,021
A520					*0,558	0,062	*0,703	0,033
A620					0,154	0,022	0,189	0,007
IC=A420+A520+A620					*10,96	1,22	*13,46	0,61
T=A420/A520					*0,69	0,01	*0,65	0,01

BC, vino blanco con UCLMS-1; BM, vino blanco con UCLMS-1M; TC, vino tinto con UCLMS-1; TM, vino tinto con UCLMS-1M. X. Valor medio y DE. Desviación estándar.

\*existieron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

#### 4.C1.3. Medida de los parámetros tecnológicos

En cuanto a los parámetros implicados en la mejora del proceso y atendiendo a los datos de la **Tabla 4.C.2**, se observa que la gran mejora tecnológica fue la mayor extracción de semifermentado a partir de las uvas tintas en los vinos elaborados con la cepa UCLMS-1M, obteniéndose un 7% más de rendimiento con respecto al control, debido a que la enzima secretada, facilitó la ruptura de las paredes celulares de las uvas, favoreciendo además la extracción de antocianos de los antocianoplastos (Rogerson *et al.* 2000), responsables del incremento de la intensidad colorante. Respecto al tiempo de filtración y la viscosidad cinemática, no se observaron diferencias significativas entre los vinos elaborados con ambas cepas.

**Tabla 4.C.2.** Efecto de la actividad pectinolítica sobre el tiempo de filtración, viscosidad y rendimiento de extracción (sólo en tintos) de los vinos elaborados con la cepa UCLMS-1 y -1M.

	BC		BM		TC		TM	
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE
Tiempo de filtración (s)	68,7	3,8	81,2	13,1	550,2	36,2	545,6	34,6
Viscosidad cinemática (csK)	1,10	0,03	1,11	0,03	1,24	0,01	1,25	0,01
Rendimiento de extracción (%)					*75,3	1,6	*82,3	0,5

BC, vino blanco con UCLMS-1; BM, vino blanco con UCLMS-1M; TC, vino tinto con UCLMS-1; TM, vino tinto con UCLMS-1M. X. Valor medio y DE. Desviación estándar.

\*existieron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

#### 4.C2.4. Volátiles mayoritarios

En la **Tabla 4.C.3** se recogen los valores obtenidos para los volátiles mayoritarios, analizados mediante CG. En los vinos blancos no se obtuvo ninguna variación significativa en los compuestos analizados, sin embargo, en los tintos se produjo un incremento en la concentración de metanol en los elaborados con la cepa UCLMS-1M, lo cuál es lógico debido a la degradación de las pectinas de la uva. Sin embargo, estos valores se encontraron por debajo del valor máximo permitido en la legislación (500 mg/L).

**Tabla 4.C.3.** Volátiles mayoritarios (mg/L) en los vinos analizados.

	BC		BM		TC		TM	
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE
Acetaldehído	11,1	0,3	10,8	0,1	10,0	0,6	12,3	1,3
metanol	26,9	3,1	23,5	2,5	*39,5	4,5	*145,0	11,0
1-propanol	13,1	1,9	13,9	0,8	35,9	4,5	30,9	2,6
acetato de etilo	34,6	4,2	34,7	3,1	50,5	13,6	55,3	8,4
isobutanol	26,3	2,1	22,7	1,4	24,4	2,4	24,4	1,2
1-butanol	-	-	-	-	2,8	0,2	2,5	1,2
2metil1butanol	27,8	1,1	26,8	1,3	51,3	3,0	48,1	2,1
3metil 1 butanol	106,9	5,3	98,3	3,6	140,2	7,3	136,3	4,1

BC, vino blanco con UCLMS-1; BM, vino blanco con UCLMS-1M; TC, vino tinto con UCLMS-1; TM, vino tinto con UCLMS-1M. X. Valor medio y DE. Desviación estándar.

\*existieron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

#### **4.C2.5. Análisis sensorial**

Con el fin de conocer si existían diferencias significativas, entre los distintos vinos, se realizó una prueba triangular con los elaborados con las cepas UCLMS-1 y -1M. Los datos estadísticos mostraron que no existieron diferencias significativas entre ellos ( $p \leq 0,05$ ), por lo que no se pudieron someter a un análisis sensorial más exhaustivo.

Por lo tanto, las modificaciones en el contenido en polisacáridos pécticos no tienen ninguna consecuencia directa en el gusto o el sabor de vino.

De los datos expuestos, se deduce que la ventaja principal del uso de cepa modificada, reside sobre todo en un mayor rendimiento de la extracción del mosto-vino, afectando además, positivamente algunas de las variables relacionadas con la apariencia.





## **5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD GLICOSIDÁSICA EN LEVADURAS VÍNICAS**



En este capítulo se aborda el estudio de la actividad enzimática  $\beta$ -glucosidásica en levaduras de origen vínico.

Para facilitar su lectura se ha dividido en 3 subapartados (A, B y C), y en cada uno de ellos se incluye su material y métodos y resultados.

El primero (A), hace referencia al estudio “in vitro” (cuali y cuantitativo) de esta actividad en distintas cepas de *S. cerevisiae*. En el segundo (B) se estudia la hidrólisis de los glicósidos de un mosto moscatel por la acción de ciertas levaduras *Saccharomyces* y no *Saccharomyces*, y por último en el tercero (C) se aborda el fraccionamiento de los precursores aromáticos glicosilados de uvas blancas, su hidrólisis y transformación por la acción de *S. cerevisiae* UCLMS-1.



## 5. A. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD $\beta$ -GLUCOSIDÁSICA EN CEPAS DE *S. cerevisiae*

### 5. A1. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 5.A1.1. Cepas de levadura empleadas

Se estudió la actividad  $\beta$ -glucosidásica en las 61 cepas de *S. cerevisiae*, empleadas en el apartado 4.A1.1.

#### 5.A1. 2. Medios de cultivo

Se utilizaron varias sustancias con enlaces glucosídicos como la esculina, arbutina, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (pNPG), y 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucopiranosido (MUG), (Sigma), como sustratos para determinar la actividad  $\beta$ -glucosidásica. Estos sustratos se adicionaron a tres medios de cultivo diferentes (YPD, SC y mosto comercial) para evaluar la actividad de las cepas. La composición de los medios sólidos fue:

YPD (extracto de levadura 1 %, peptona 2 %, glucosa 2 %), YPD+pNPG (1mM), YPD+Fe<sup>3+</sup> (citrato amónico férrico 0,02%), YPD+Fe<sup>3+</sup>+esculina (0,5 %), YPD+Fe<sup>3+</sup>+arbutina (0,5 %) e YPD+MUG (0,04 %)(Nebreda *et al.*, 1986).

SC (YNB 0,67 %, glucosa 2%), para la cepa de laboratorio W3031b, este medio se adicionó de los complementos necesarios para suplir las auxotrofías. SC+pNPG (1mM), SC+Fe<sup>3+</sup> (citrato amónico férrico 0,02%), SC+Fe<sup>3+</sup>+esculina (0,5 %), SC+Fe<sup>3+</sup>+arbutina (0,5 %) y SC+MUG (0,04%).

Mosto de uva comercial, Mosto+pNPG(1mM), Mosto+Fe<sup>3+</sup> (citrato amónico férrico, 0,02%), Mosto+Fe<sup>3+</sup>+esculina (0,5 %), Mosto+Fe<sup>3+</sup>+arbutina (0,5 %) y Mosto+MUG (0,04%).

Todos los medios sólidos se suplementaron con agar al 2%.

### 5.A1.3. Ensayo cualitativo

Con el fin de ensayar la actividad enzimática de forma cualitativa, 5 $\mu$ L de un cultivo joven crecido en YPD se inocularon en los distintos sustratos y las placas se incubaron a 30°C durante 48-72 h. Los medios de cultivo base (YPD, SC, mosto) sin el sustrato glucosilado se usaron como controles negativos, y la enzima pura procedente de almendras (E.C. 3.2.1.21) (Sigma) como control positivo.

Los resultados se clasificaron como positivos por la aparición de un halo oscuro alrededor de las colonias en las placas con arbutina y esculina, en aquellas con pNPG, por un halo amarillo tras el revelado con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M (Adam y Polaina, 1991) y finalmente aquellas con MUG presentaron fluorescencia bajo radiación UV (260nm) (Nebreda *et al.*, 1986, Charoenchai *et al.*, 1997).

La capacidad de las cepas para crecer utilizando esculina o arbutina (0,5%) como única fuente de carbono se ensayó en medio de YNB (0,67%). Antes de la inoculación los cultivos se crecieron en medio líquido YNB (0,67%) durante 6 h a 30°C para agotar las reservas endógenas de azúcares (Ciani y Picciotti, 1995).

### 5.A1.4. Ensayo cuantitativo

Para las determinaciones cuantitativas, las levaduras se crecieron en agitación a 30°C en los medios de cultivo base (YPD, SC y mosto de uva). En el caso del mosto también se ensayaron condiciones de anaerobiosis, utilizando matraces con válvulas Müller rellenas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y sin agitación.

El crecimiento se monitorizó por medida de la absorbancia a 600 nm. Al final de la fase de crecimiento exponencial, el cultivo se centrifugó (1780 g, 4 °C/10 min), y las dos fracciones obtenidas, tanto el sobrenadante y como el pellet de células, previamente lavado con agua fría estéril, se conservaron a –20°C hasta su análisis.

La actividad  $\beta$ -glucosidásica, se cuantificó mediante la medida espectrofotométrica a 400nm del p-nitrofenol (pNPh) liberado a partir de pNPG y de pNPX (p-nitrofenol- $\beta$ -D-xilopiranosido). Todos los ensayos se realizaron por duplicado y de la manera que sigue:

**a) Determinación en el sobrenadante.** 1 mL de mezcla de reacción (5 mM de pNPG o pNPX, 100 mM tampón acetato pH 4,0, y 0,8mL de sobrenadante), se incubó a 50 °C durante 25 min. La reacción se paró por la adición de 2 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M y se midió la absorbancia a 400 nm.

**b) Determinación en las células:** El pellet de células se resuspendió en 1mL de tampón citrato-fosfato 100 mM pH 4,0 y 5mM de pNPG o pNPX, la mezcla se incubó a 40 °C durante 25 min y se paró por la adición de 2 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M; la muestra se centrifugó para eliminar las células y se midió la absorbancia a 400 nm.

El blanco utilizado se preparó adicionando 2 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M a la muestra, añadiendo después la cantidad adecuada de pNPG o pNPX a la mezcla de reacción.

Se preparó una curva de calibrado utilizando pNPh como estándar (10-100 nmol  $\text{mL}^{-1}$ ). La actividad enzimática se expresó como nmol de pNPh  $\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  para el sobrenadante y nmol de pNPh $\cdot\text{mg}\cdot\text{clas}^{-1}\text{h}^{-1}$  para las células.

#### 5.A1.5. Efecto del crecimiento celular, del pH y de la temperatura

Por otro lado, se estudió la relación entre la actividad enzimática del sobrenadante y el crecimiento celular, para ello se inocularon 50mL de YPD con 5mL de un cultivo joven, se mantuvo a 30°C en agitación y se midió la actividad a diferentes densidades ópticas (600nm) sobre pNPG.

Se estudió además la actividad a distintos pHs (3,4,5,6 y 7) a 50°C y temperaturas (20,30,40,50 y 60°C), a pH 4,0, comprobando además el efecto de las altas y bajas temperaturas, tras el autoclavado (121°C/20 min) y la congelación

(-20°C/48h) respectivamente. Las levaduras se crecieron en YPD, y la actividad se determinó midiendo el grado de hidrólisis del pNPG.

Para comprobar si existían diferencias significativas entre la actividad enzimática a diferentes pH y temperaturas, se aplicó a los datos el ANOVA de un factor (comparación múltiple DMS), utilizando el programa estadístico SPSS (versión 10).



## 5.A2. RESULTADOS

### 5.A2.1. Ensayo cualitativo

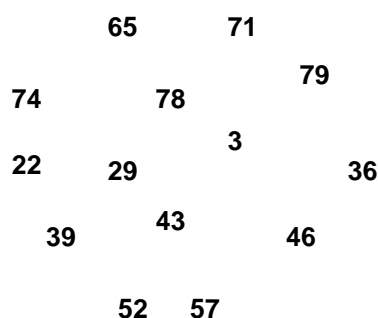
Cuando las cepas estudiadas se ensayaron sobre los diferentes sustratos y medios, se observó que la actividad  $\beta$ -glucosidásica varió apreciablemente dependiendo tanto del medio base, como del sustrato glucosilado empleado; así el mayor grado de hidrólisis se obtuvo al utilizar YPD como medio base, mientras que en el medio SC y el mosto fue menor, por lo que se sugiere que aquel medio pudiera contener algún compuesto implicado en la expresión de la actividad considerada.

De los sustratos con enlaces  $\beta$ -glucosídicos, pNPG, MUG, y esculina rindieron los mejores resultados. Para el screening rápido cualitativo de este tipo de actividad enzimática en un gran número de cepas se recomienda el uso de MUG en cualquiera de los medios de cultivo base y de esculina en YPD. El uso de pNPG en medio sólido no se recomienda, porque el color del pNPh liberado es muy similar al del medio de cultivo por lo que resulta muy difícil apreciarlo.

En la **Figura 5.A.1**, se muestra la actividad enzimática de algunas de las cepas estudiadas crecidas en medio SC+MUG, apreciándose la fluorescencia bajo la luz ultravioleta, como consecuencia de la liberación del 4-metilumbeliferol.

Por otra parte, ninguna de las cepas ensayadas pudo crecer utilizando la esculina o la arbutina como únicas fuentes de carbono. De las 61 cepas ensayadas, la UCLMS-39 se seleccionó para los demás ensayos por mostrar una adecuada actividad, y porque además fue la utilizada en el capítulo anterior para la elaboración de la genoteca. También se utilizó la cepa de laboratorio W3031b.

En la **Tabla 5.A.1** se recogen los resultados cualitativos en medios sólidos de las dos cepas *S. cerevisiae*, UCLMS-39 y W3031b. En ella se observa que ambas cepas fueron incapaces de hidrolizar la arbutina, mientras que la esculina sólo la hidrolizaron cuando se crecieron en YPD.



**Figura 5.A.1.** Actividad β-glucosidásica de algunas cepas de *S. cerevisiae* crecidas en medio SC(agar)-MUG, 12 h a 30°C.

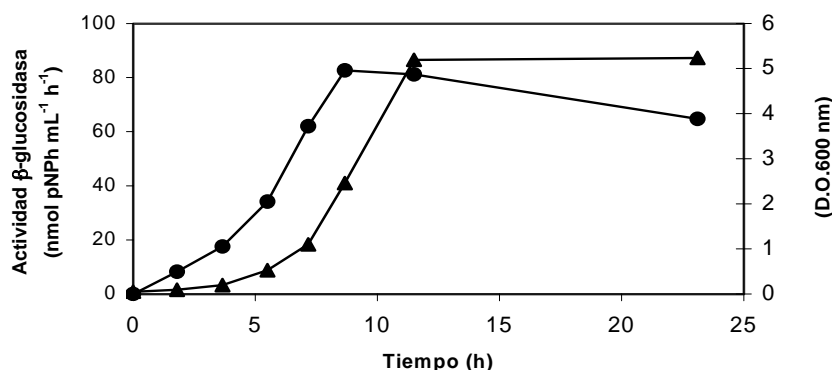
**Tabla 5.A.1.** Actividad β-glucosidásica de las dos cepas crecidas en varios medios de cultivo adicionados de diferentes sustratos glucosídicos.

Glucósido	YPD		SC		Mosto	
	UCLMS-39	W303	UCLMS-39	W303	UCLMS-39	W303
Esculina-Fe <sup>3+</sup>	+++	+++	-	-	-	-
Arbutina-Fe <sup>3+</sup>	-	-	-	-	-	-
pNPG	++	++	++	+	-	-
MUG	+++	+++	++	++	++	+

Grado de hidrólisis de los sustratos, alta: +++, media: ++, baja: +, no detectada -.

### 5.A2.2. Ensayo cuantitativo

Se estudió la relación entre la actividad β-glucosidásica y el crecimiento celular de la cepa UCLMS-39 (**Figura 5.A.2**). La máxima actividad se obtuvo casi al final de la fase de crecimiento exponencial y por lo tanto se eligió para el estudio de la actividad en el resto de los ensayos.



**Figura 5.A.2.** Relación entre la actividad enzimática de la cepa UCLMS-39 en el sobrenadante (●) y el crecimiento celular (▲).

Por otra parte, la actividad se cuantificó en dicha cepa en diferentes medios de crecimiento (YPD, SC y mosto) y distintos sustratos glucosilados (pNPG y pNPX). Los resultados se presentan en la **Tabla 5.A.2**, obteniendo los valores máximos para las células en medio YPD y pNPG como sustrato, reduciéndose en un 79%, cuando se utilizó mosto como medio de cultivo. No se detectó actividad alguna cuando la levadura se creció en medio SC.

La actividad β-glucosidásica se redujo el 90% y el 47%, en las células y el sobrenadante, respectivamente, crecidas en YPD, cuando se utilizó pNPX en lugar de pNPG, como sustrato.

Como la fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico, se estudió sobre pNPG, la actividad β-glucosidásica de UCLMS-39, crecida en mosto y en anaerobiosis, observándose una reducción del 25% para las células ( $31,0 \text{ nmol pNPh} \cdot \text{mg} \cdot \text{cl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) y del 50 % ( $13,4 \text{ nmol pNPh} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) para el sobrenadante comparados con los valores obtenidos en aerobiosis.

**Tabla 5.A.2.** Actividad  $\beta$ -glucosidásica sobre pNPG y pNPX de la cepa UCLMS-39 crecida en diferentes medios líquidos.

	pNPG				pNPX	
	SC	YPD	Mosto <sup>(1)</sup>	Mosto <sup>(2)</sup>	SC	YPD
sobrenadante*	nd	98	28	13	nd	52
Células**	nd	199	41	31	nd	28

\* resultados expresados en nmol pNPh mL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>

\*\* resultados expresados en nmol pNPh mg clas<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>

nd: no detectado

<sup>(1)</sup> Aerobiosis, <sup>(2)</sup> Anaerobiosis

### 5.A2.3.Efecto de la temperatura y del pH

Cuando se estudió el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la cepa considerada, tanto en el sobrenadante, como en las células (**Figura 5.A.3a**), la máxima actividad se obtuvo a 50°C para el sobrenadante, aunque el análisis de la varianza ( $p \leq 0,05$ ), no encontró diferencias significativas entre 40°C y 50°C; en cambio, para las células la mayor actividad se obtuvo a 40°C, y en este caso, sí había diferencias significativas cuando la temperatura se aumentó hasta 50°C, existiendo además diferencias significativas entre todas las temperaturas ensayadas a excepción de entre 30°C y 60°C.

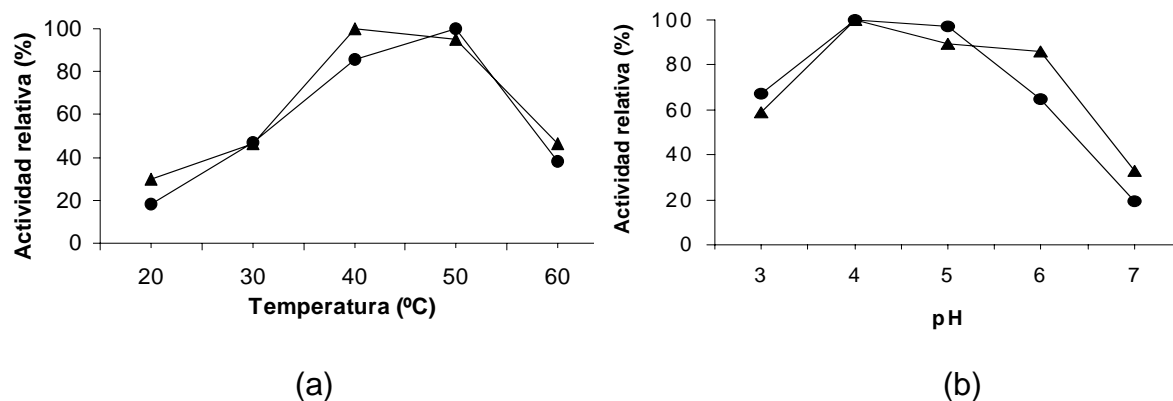
El 100% de actividad correspondió a 96,7 nmol·pNPh mL<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> para el sobrenadante y a 287,6 nmol pNPh mg clas<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> para el pellet de células enteras.

La actividad tras la congelación, no se vio prácticamente alterada ni en las células ni en el sobrenadante, obteniendo una pérdida máxima del 3,5%, sin embargo, al someter las muestras a condiciones de esterilización (121 °C/20 min), la actividad se eliminó completamente debido a la desnaturalización de la enzima, pudiéndose utilizar estas muestras como control negativo.

La **Figura 5.A.3b**, representa el efecto del pH sobre la actividad enzimática de la cepa UCLMS-39, obteniendo el máximo a pH 4,0, tanto en el sobrenadante como

en el pellet. En ambos casos no existieron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre pH 4 y 5, sin embargo, sí se observaron para el resto de los pH estudiados (3,6 y 7). El 100% de actividad en el sobrenadante correspondió a  $75,9 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , y para el pellet de células enteras  $237,46 \text{ nmol pNPh mg clas}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

El pH y temperaturas óptimas obtenidos para la cepa UCLMS-39, coinciden con los encontrados para las  $\beta$ -glucosidasas de las uvas (Lecas *et al.*, 1991), de las levaduras (Delcroix *et al.*, 1994 y Rosi *et al.*, 1994) y de los mohos (Riou *et al.*, 1998), difiriendo únicamente en los resultados de Yanai y Sato (1999), para *Debaryomyces hansenii* cuyos valores óptimos fueron pH 7 y  $25^\circ\text{C}$ .



**Figura 5.A.3.** Efecto de la temperatura (a) y del pH (b) en la actividad  $\beta$ -glucosidásica de la cepa UCLMS-39, en el sobrenadante (●) y en células enteras(\*)



## 5.B. HIDRÓLISIS Y TRANSFORMACIÓN DE LOS GLICÓSIDOS DE MOSTO MOSCATEL POR LA ACCIÓN DE DISTINTAS ESPECIES DE LEVADURAS VÍNICAS

### 5.B1. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 5.B1.1. Levaduras estudiadas

De la colección del levaduras del laboratorio (Úbeda, 1995 , Izquierdo, 1996, Fernández, 1999 , 2000) se utilizaron un total de 9 cepas de origen vínico pertenecientes a las especies *Saccharomyces cerevisiae* (UCLMS-1,-31 y -39), *Metschnikowia pulcherrima* (UCLMNS-12 y -20), *Debaryomyces hansenii* (UCLMNS-1), *Kluyveromyces thermotolerans* (UCLMNS-7), *Hanseniaspora uvarum* (UCLMNS-24), *Pichia kluyveri* (UCLMNS-6), siendo algunas de ellas renombradas mediante PCR-RFLP, utilizando un mayor número de enzimas de restricción (Esteve-Zarzoso *et al.*, 2000, Fernández-Espinar *et al.*, 2001) y una cepa no vínica, *Candida molischiana* CBS 136 (Sánchez-Torres *et al.*, 1998). En la **Tabla 5.B.1**, se encuentra recogida la correspondencia entre la numeración original y la actual.

**Tabla 5.B.1.** Correspondencia entre la numeración original (Úbeda, 1995 (A), Izquierdo, 1996(B), Fernández, 1999 (C), 2000(D) y la actual (UCLMS y UCLMNS).

Anterior	1 (D)	84(D)	85(D)	132(D)	9(C)	31(C)
UCLMNS	1	6	7	12	20	24
Anterior	325(A)	301(A)	A7(B)			
UCLMS	1	31	39			

### 5.B1.2. Condiciones de cultivo

Las levaduras se crecieron en un mosto sintético (sacarosa (20%), extracto de malta (2%), extracto de levadura (1%), ácido tartárico (0,35%), sulfato amónico (0,1%), fosfato amónico (0,1%) e inositol (0,03%), pH 3,2), y se incubaron a 30°C sin agitación. Cuando los cultivos alcanzaron una biomasa aproximada de  $6 \times 10^7$  cl/mL, evaluada mediante el recuento de células en una cámara de Thoma, se procedió del siguiente modo:

25 mL del cultivo se centrifugaron (2260xg, 5 min), y el pellet se lavó dos veces con agua destilada estéril fría (células enteras, CE). Por otro lado, y con el fin de obtener un extracto celular (EAC), las células previamente lavadas de otros 25 mL de cultivo, se trataron con acetona fría -20°C (Cordonnier y Bayonove, 1974); con este tratamiento se pretendía desorganizar tanto la membrana plasmática como las membranas de los orgánulos citoplasmáticos, sin alterar la parte proteica, obteniendo así un preparado enzimático de las células.

### 5.B1.3. Cuantificación de la actividad $\beta$ -glucosidásica

La actividad se cuantificó en CE y EAC ( $6 \times 10^7$ ), crecidas como se describe en el apartado anterior, mediante la determinación del pNPh liberado a partir del p-NPG.

El pellet se resuspendió en 0,2 mL de tampón citrato fosfato 0,1M pH 5,0 y se le adicionó 0,2 mL de una solución 5mM de pNPG; la mezcla se incubó a 30°C durante 1h, parando la reacción con 1,2 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M (Mendes-Ferreira, *et al.*, 2001). La cantidad de pNPh liberado se determinó espectrofotométricamente a 400 nm, usando una recta de calibrado pNPh ( $10\text{-}100 \text{ mmol mL}^{-1}$ ).

La capacidad de las cepas para crecer utilizando celobiosa como única fuente de carbono se ensayó en un medio YNB (0,67%), celobiosa (0,5%) y agar (2%). Antes de la inoculación, los cultivos se crecieron en medio líquido YNB (0,67%) durante 6 h a 30°C para agotar las reservas endógenas de azúcares (Ciani y Picciotti, 1995).



#### **5.B1.4. Aislamiento de los glicósidos**

Se utilizó un mosto de la vendimia de 2000, de la variedad *Moscato bianco* (sin. Muscat petit grain) proporcionado por una bodega de la región del Piamonte (Italia).

Los glicósidos se aislaron utilizando cartuchos C18 RP (Waters) de 10g, activados con metanol y agua, según el método propuesto por Di Stefano (1991). 200mL de mosto diluido con un volumen igual de agua se eluyeron a través del cartucho, la fracción correspondiente a los terpenos libres se eluyó con diclorometano y se desechó, y la fracción glicosídica se recuperó con 30 mL de metanol, evaporándose hasta sequedad en un rotavapor a vacío y disolviéndose a continuación en tampón citrato-fosfato 0,1M (pH 5,0).

#### **5.B1.5. Efecto de las levaduras sobre los glicósidos**

Los glicósidos procedentes de 25mL de mosto, se inocularon con las CE y los EAC y se incubaron a 30°C durante 48h. Tras la incubación, las muestras se centrifugaron, se adicionaron de 1-heptanol utilizado como patrón interno y se pasaron a través de cartucho C18 RP de 300mg, previamente activado con metanol y agua. Las agliconas liberadas tras la hidrólisis, se eluyeron con 4 mL de diclorometano, eliminándose el agua residual con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se transfirieron a un matraz de destilación de 100mL, se concentraron y fueron analizadas mediante GC-MS.

Una fracción tratada con 0,2 mL de enzima pectinolítica comercial con actividad glicosidásica secundaria (Pectinol HS, Genecor), y otra sin inocular se utilizaron como controles positivo y negativo, respectivamente.

#### **5.B1.6. Cromatografía de gases- espectrometría de masas**

Los análisis se llevaron a cabo en un Cromatógrafo de Gases 5890 Series II HP acoplado a un detector de masas 5970 HP (Hewlett-Packard), utilizando una columna capilar INNOWAX (J&W Scientific) (30m X 0,25mm D.I x 0,25µm). Las

condiciones cromatográficas fueron: 30°C/2 min, de 30°C a 60°C a 30°C/min, de 60°C a 160°C a 2°C/min, de 160°C a 220°C a 3°C/min y 220°C/13 min.

La temperatura del inyector fue de 250°C y la de la interfase y del detector MS de 230°C. El rango de adquisición de masas varió de 28 a 300 u.m.a. y la energía de ionización fue de 70 eV. El Helio se utilizó como gas portador (70Kpa), y el modo de inyección fue en “splitless”.

El método aplicado para la identificación y cuantificación se orientó para detectar la existencia de diferencias relativas entre las cantidades y tipo de agliconas liberadas por la acción de las distintas levaduras. La mayoría de las agliconas se identificaron mediante comparación de los tiempos de retención y espectros de masas con los descritos previamente (Di Stefano, 1991) y se cuantificaron por la comparación de las alturas de los picos cromatográficos con la del patrón interno.

## 5. B2. RESULTADOS

En la **Tabla 5.B.2**, se recoge la capacidad para hidrolizar el p-NPG de las diez cepas de levadura analizadas. Tanto las CE como sus EAC hidrolizaron en mayor o menor medida el pNPG, si bien el mayor grado de hidrólisis se obtuvo en el caso de los EAC a excepción, de *M. pulcherrima*. La mayor actividad tanto en CE como en EAC la presentó la cepa no vínica *C. molischiana*. Hay que resaltar que los EAC de *S. cerevisiae*, liberaron más pNPG que algunas no *Saccharomyces*.

Tabla **5.B.2**. Actividad enzimática expresada como nmol pNPh mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en las especies estudiadas.

Levaduras estudiadas	CE		EAC	
	X	DE	X	DE
<i>C. molischiana</i> CBS 136	188,6	18,9	238,3	0,7
<i>D. hansenii</i> (UCLMNS-1)	2,9	0,3	17,7	1,2
<i>K. thermotolerans</i> (UCLMNS-7)	1,3	0	7,6	0,7
<i>M. pulcherrima</i> (UCLMNS-12)	12,3	0,1	5	0,2
<i>M. pulcherrima</i> (UCLMNS-20)	4,2	0,1	5,8	0,3
<i>P. kluyveri</i> (UCLMNS-6)	1,4	0,3	6,5	0,6
<i>H. uvarum</i> (UCLMNS-24)	1,3	0	1	0,7
<i>S. cerevisiae</i> (UCLMS-1)	1,4	0	10,1	0,2
<i>S. cerevisiae</i> (UCLMS-31)	1,2	0,1	15,7	1,3
<i>S. cerevisiae</i> (UCLMS-39)	6,6	0,1	6,7	1,1

CE. Células enteras, EAC. Extracto acetónico celular, X. Valor medio, DE. Desviación estándar.

Cuando todas estas cepas se crecieron en celobiosa como única fuente de carbono, solo las cepas de *M. pulcherrima*, *D. hansenii*, *C. molischiana* y *H. uvarum*, fueron capaces de utilizarla.

Al estudiar el comportamiento de las cepas (tanto en CE como en EAC), frente a los glicósidos aislados del mosto moscatel, se obtuvieron los resultados que se muestran en las **Tablas 5.B.3 y 5.B.4**, comparándose con los de Pectinol (control positivo) y con la muestra no inoculada (control negativo).

La **Tabla 5.B.3**, sólo recoge los volátiles liberados por *C. molischiana* y *H.uvarum*, que fueron las que hidrolizaron mayor número de compuestos y en más cantidad.

*C. molischiana* mostró la mejor capacidad para hidrolizar la mayoría de los compuestos. Esta especie caracterizada por poseer una gran actividad glicosidásica (Gunata *et al.*, 1990b) liberó, más cantidad de algunas agliconas que el pectinol; este hecho fue más evidente para las células enteras. Estos resultados confirmaron que esta levadura posee actividad  $\beta$ -glucosidásica y glicosidásica.

De todas las levaduras de origen vínico estudiadas la que hidrolizó una mayor cantidad y variedad de glicósidos fue *Hanseniaspora uvarum*, que actuó sobre compuestos como, los óxidos furánicos y piránicos del linalol. Sin embargo, no hidrolizó compuestos como el p-ment-1-eno-7,8-diol, la 3-hidroxi- $\beta$ -damascona ni la 3-hidroxi- $\beta$ -ionona, liberados tanto por pectinol, como por *Candida molischiana*. La cantidad de compuestos fenólicos, 4-vinilfenol y 4-vinilguayacol, fue muy escasa para esta cepa, sin embargo, *C. molischiana* produjo una gran cantidad de ellos.

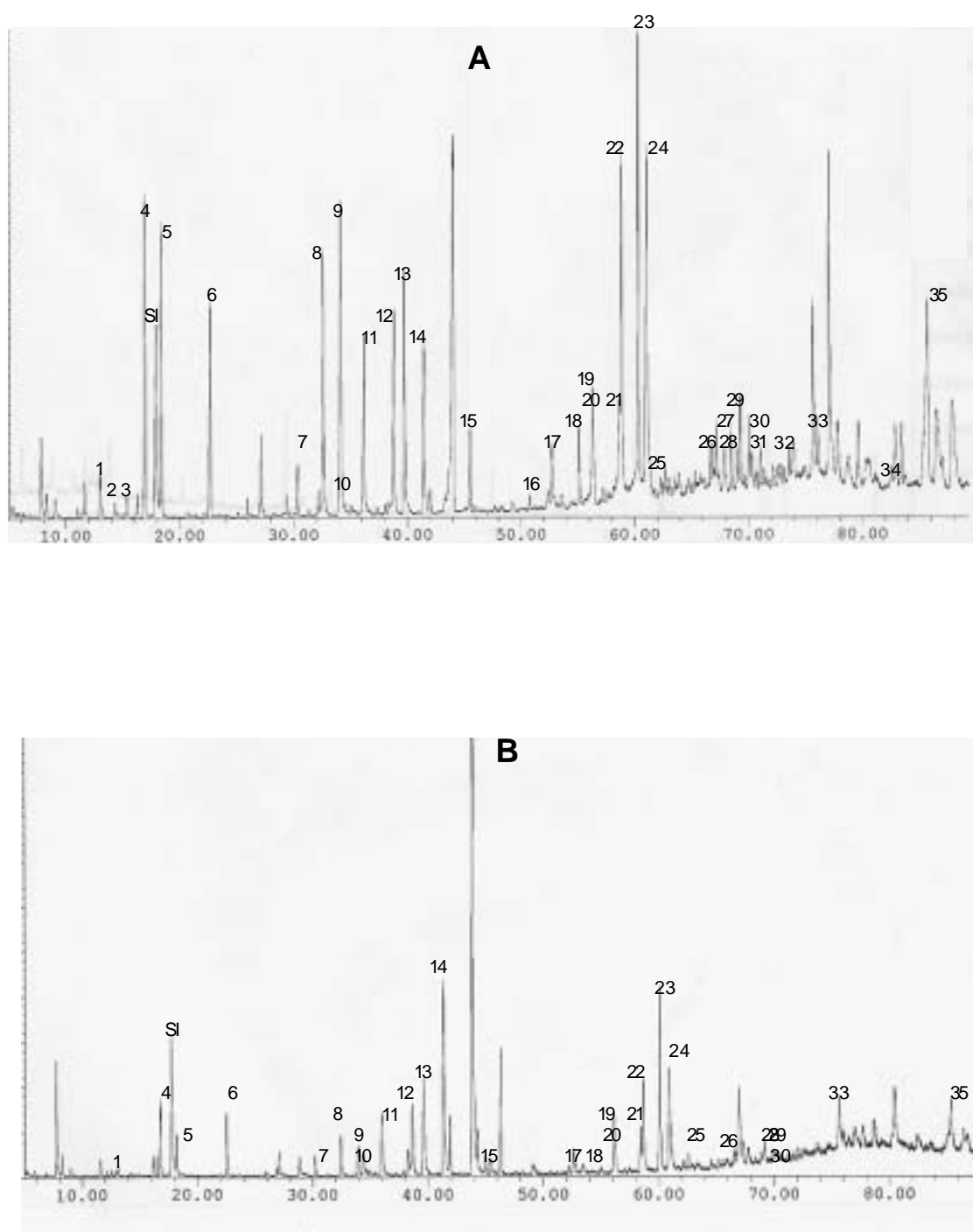
En la **Figura 5.B.1** se muestran los cromatogramas obtenidos mediante CG-EM al someter a los glicósidos del mosto moscatel a la acción del pectinol y de las CE de *H. uvarum*; los números que aparecen en ellos corresponden a los compuestos indicados en la tabla 4.

**Tabla 5.B.3.** Volátiles( $\mu\text{g/L}$ ) liberados por *C. molischiana* (Cm) y *H. uvarum* (Hu) a partir de un mosto Moscatel incubado con células enteras (CE) y con extractos acetónicos celulares (EAC), comparado con el control negativo (CN) y pectinol (CP).

	Compuesto ( $\mu\text{g/L}$ )	Control		CBS 136 (Cm)		UCLMNS-24 (Hu)	
		CN	CP	CE	EAC	CE	EAC
1	1-Hexanol	-	145,3	152,0	119,4	-	85,6
2	Cis-3-hexen-1-ol	-	44,7	33,4	29,8	-	44,4
3	Trans-2-hexen-1-ol	-	63,6	12,2	44,8	-	-
4	Trans-furanlinalol oxido	-	910,8	1327,6	925,3	313,2	256,7
5	Cis-furanlinalol oxido	-	838,3	1417,3	955,1	167,5	158,5
6	Linalol	-	617,1	879,1	542,2	262,2	212,4
7	$\alpha$ -Terpineol	-	151,4	170,4	144,3	83,8	72,9
8	Trans-piranlinalol oxido	-	774,2	771,5	746,2	162,1	150,5
9	Cis-piranlinalol oxido	-	896,5	1031,6	1104,3	118,4	95,1
10	Citronelol	-	36,3	376,8	-	87,4	34,9
11	Nerol	-	512,3	636,9	651,7	253,1	300,1
12	Geraniol	-	582,1	437,8	731,3	284,1	388,3
13	Alcohol bencílico	-	698,6	735,6	587,0	389,7	326,5
14	2-Feniletanol	-	494,8	825,3	412,9	771,2	467,8
15	Endiol	74,9	232,8	309,7	263,7	-	103,0
16	Terpina1	-	43,7	35,3	119,3	-	-
17	Diol 2	-	185,5	206,5	145,5	101,8	80,0
18	4-Vinilguayacol	-	223,7	565,1	405,6	24,2	21,3
19	Hidroxicitronelol	182,4	331	453,7	334,0	232,7	213,2
20	8-Hidroxi dihidrolinalol	-	261,8	374,9	286,3	121,1	110,2
21	Hidroxinerol	-	269,2	-	283,9	-	-
22	Trans-8-hidroxilinalol	71,7	1007,1	1211,0	1046,1	383,1	346,5
23	Cis-8-hidroxilinalol + Trans-hidroxigeraniol	385,1	1304,2	1417,3	1351,9	729,6	723,7
24	Ácido geránico	-	978	932,9	410,4	414,6	255,9
25	4-Vinilfenol	58,6	90,9	1812,1	1239,2	67,9	80,0
26	p-Ment-1-eno-7,8-diol	-	134,6	146,7	124,1	-	-
27	3-Hidroxi- $\beta$ -damascona	-	194,6	266,2	219,5	-	-
28	8-Hidroxinerol	-	114,6	116,8	105,2	50,9	48
29	8-Hidroxigeraniol	-	264,6	119,5	131,2	97,0	110,2
30	3-Oxo- $\alpha$ -ionol	-	203,7	184,7	136,0	48,5	35,9
31	3,9-Dihidroxi-megastigman-5-eno	-	118,2	184,7	105,0	-	-
32	3-Hidroxi- $\beta$ -ionona	-	101,9	111,4	85,9	-	-
33	Alcohol homovanílico	-	119,5	383,1	288,7	218,2	151,1
34	3,4,5-Trimetoxifenol	-	60,0	73,4	52,5	-	67,5
35	Vomifoliol	-	535,6	470	396,1	227,9	159,9

Endiol (2,6-dimetil-7-octen-2,6-diol); terpina1 (*cis*-p-mentane-1,8-diol); diol 2 (2,6-dimetil-1,7-octadien-3,6-diol); hidroxi-citronelol (3,7-dimetil-octan-1,7-diol); 8-hidroxi dihidrolinalol (2,6-dimetil-7-octen-1,6-diol); hidroxinerol (*cis*-3,7-dimetil-2-octen-1,7-diol); *trans*-8-hidroxilinalol (*trans*-2,6-dimetil-2,7-octadien-1,6-diol); *cis*-8-hidroxilinalol (*cis*-2,6-dimetil-2,7-octadien-1,6-diol); *trans*-hidroxigeraniol (*trans*-3,7-dimetil-2-octen-1,7-diol).

-. No detectado.



**Figura 5.B.1.** Cromatogramas CG-EM obtenidos por la acción del Pectinol (A) y de las CE de *H. uvarum* (B). La numeración coincide con los compuestos de la **Tabla 5.B.3**.

En la **tabla 5.B.4**, aparecen el resto de las levaduras estudiadas y únicamente los compuestos liberados.

Todas las especies a excepción de *P. kluyveri*, hidrolizaron en mayor o menor grado, los glicósidos del nerol, geraniol, linalol, y 8-hidroxidihidrolinalol.

Las 3 tres cepas de *S. cerevisiae* estudiadas, liberaron una pequeña porción de 1-hexanol. El nerol, geraniol, *cis*-8-hidroxilinalol y *trans*-hidroxigeraniol se hidrolizaron en mayor cantidad cuando se utilizó el EAC. En particular, la cepa UCLMS-31 mostró valores ligeramente superiores a las otras dos.

*D. hansenii*, *K. thermotolerans*, y *S. cerevisiae* (UCLMS-31), hidrolizaron algo de 3-oxo- $\alpha$ -ionol.

Para las dos cepas pertenecientes a la especie *M. pulcherrima*, se obtuvieron valores muy similares entre ellas, aunque estos se redujeron drásticamente cuando se utilizó el EAC.

Respecto al citronelol, apenas se detectó en las muestras con los EAC y sí en cambio en aquellas tratadas con CE, de lo que se puede deducir que en algunos casos parte del citronerol proviene del geraniol metabolizado por la célula viva (Di Stefano, 1992, Dugelay *et al.*, 1992, Delcroix *et al.*, 1994).

Las concentraciones de 2-feniletanol, 4-vinilfenol y 4-vinilguayacol en la mayoría de las cepas vínicas estudiadas aumentaron al emplear las CE. Estos resultados se pueden explicar tanto por el metabolismo de las levaduras como por la hidrólisis de sus formas conjugadas (Gunata *et al.*, 1988, Dubordieu *et al.*, 1989).

**Tabla 5.B.4.** Compuestos volátiles (µg/L) liberados a partir de los glicósidos de mosto moscatel tras la incubación con las células enteras (CE) y los extractos acétonicos celulares (EAC) de diferentes especies de levaduras vínicas.

Compuestos	UCLMNS										UCLMS					
	1 <i>Dh</i>		6 <i>Pk</i>		7 <i>Kt</i>		12 <i>Mp</i>		20 <i>Mp</i>		1 <i>Sc</i>		31 <i>Sc</i>		39 <i>Sc</i>	
	CE	EAC	CE	EAC	CE	EAC	CE	EAC	CE	EAC	CE	EAC	CE	EAC	CE	EAC
1-Hexanol	-	30,0	-	-	37,8	28,1	-	-	-	-	28,8	48,4	34,6	69,4	28,2	22,2
Linalol	29,2	-	-	-	36,1	9,4	56,6	-	121,1	-	41,6	69,8	158,4	93,4	37,0	-
α-terpineol	-	-	-	-	-	-	-	-	18,5	-	6,6	-	-	-	-	-
Citronelol	-	33,2	-	-	61,6	16,9	-	-	17,8	-	51,4	21,4	153,4	19,8	83,7	-
Nerol	63,1	93,1	-	-	105,9	168,8	134,8	27,3	146,1	-	31,0	222,9	105,2	259,1	82,0	17,1
Geraniol	82,9	90,9	-	-	141,2	199,7	113,1	23,8	145,4	-	25,2	290,5	101,5	332,7	47,6	31,6
Alcohol bencílico	39,5	-	-	-	31,2	21,6	87,5	22	82,7	-	10,6	42,7	47,0	82,1	30,0	-
2-Feniletanol	414,5	27,8	486,4	-	529,5	153,8	404,5	33,3	1202,7	-	1273,7	102,5	1525,2	133,1	735,9	19,6
4-Vinilguayacol	30,8	47,8	-	42,2	56,8	22,2	28,0	34,8	24,3	-	50,6	27,8	302,3	30,8	74,6	22,7
Hidroxicitronelol	133,9	156,9	243,2	139,2	203,4	134,9	118,7	123,5	109,5	109,1	162,9	136,9	248,5	197,3	226,1	107,1
8-Hidroxidihidrolinalol	99,8	49,1	-	-	104,8	51,8	80,8	55,7	75,5	26,4	t	69,6	t	114,1	t	48,7
Trans-8-hidroxilinalol	44,9	76,4	36,2	54,8	101,7	62,8	310,0	76,5	250,8	56,2	52,8	-	25,6	-	82,2	-
Cis-8-hidroxilinalol + Trans-hidroxigeraniol	398,0	528,3	108,1	377,4	494,2	391,9	362,8	374,0	359,1	334,1	235,5	426,9	326,0	650,7	377,5	308,2
Ácido geránico	281,9	49,1	12,5	-	458,9	68,4	46,2	-	59,7	-	145,3	199,5	512,3	222,0	222,4	45,4
4-vinilfenol	32,3	-	52,4	75,9	-	44,4	74,2	156,5	41,3	66,2	622,7	176,3	954,7	255,9	896,3	155,2
3-Hidroxi-β-damascona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	86,3	-	-
3-Oxo-α-ionol	85,1	43,7	-	-	184,5	42,5	-	-	-	-	-	-	64,0	37,0	-	42,2
Vomifoliol	123,3	92,8	39,9	-	47,3	51,7	92,4	66,1	126,6	-	57,2	-	66,6	-	74,7	-

**Dh:** *Debaryomyces hansenii*, **Pk:** *Pichia kluyveri* **Kt:** *Kluyveromyces thermotolerans* **Mp:** *Metschnikovia pulcherrima* **Pk:** *Pichia kluyveri*, **Sc:** *Saccharomyces cerevisiae*. Hidroxicitronelol (3,7-dimetil-1,7-octandiol); 8-hidroxidihidrolinalol (2,6-dimetil-7-octen-1,6-diol; *trans*-8-hidroxilinalol (*trans*-2,6-dimetil-2,7-octadien-1,6-diol); *cis*-8-hidroxilinalol (*cis*-2,6-dimetil-2,7-octadien-1,6-diol); *trans*-hidroxigeraniol (*trans*-3.7-dimetil-2-octen-1,7-diol)



El aroma de las muestras, una vez transcurrido el periodo de incubación sobre los glicósidos, varió notablemente dependiendo de las especies, presentando desde aromas florales, afrutados a herbáceos, a tabaco e incluso desagradables en algunos casos.

En el estudio preliminar sobre p-NPG, aparentemente la mayoría de las levaduras tenían actividad  $\beta$ -glucosidasa. Esta actividad, se puede medir utilizando  $\beta$ -D-glucósidos análogos al p-NPG; sin embargo estos sustratos no son adecuados debido a que la actividad  $\beta$ -1,3-glucanásica (contenidas en la mayoría de las levaduras) podría hidrolizarlos (Strauss *et al.*, 2001). Sí comparamos los datos obtenidos sobre los glicósidos de uva moscatel y del pNPG, podemos concluir que éste último no es un sustrato adecuado para cuantificar la actividad  $\beta$ -glucosidásica, porque la mayoría de las levaduras fueron capaces de hidrolizarlo y sin embargo apenas hidrolizaron los glicósidos del moscatel. Cuando todas las cepas se crecieron en celobiosa como única fuente de carbono, las pertenecientes a las especies *M.pulcherrima*, *D. hansenii*, *C. molischiana* y *H. uvarum* fueron capaces de utilizarla; sin embargo, las dos primeras, escindieron los glicósidos de la uva con escasa intensidad.

Darriet *et al.* (1988) y Mateo y Di Stefano (1997) publicaron que algunas cepas de *S. cerevisiae* poseían actividad  $\beta$ -glucosidasa, y en este trabajo se muestra que esto ocurre con determinados glicósidos.

Otros autores han estudiado la actividad  $\beta$ -glucosidásica en levaduras no *Saccharomyces* como *Hanseniaspora vini* (Vasserot *et al.*, 1989), *D. hansenii* (Yanai y Sato, 1999), *C.molischiana* y *C. wickerhanii* (Gunata 1990b). Este trabajo, prueba que *C. molischiana* es capaz de hidrolizar los glicósidos del mosto Moscatel con mayor intensidad que el Pectinol. Sin embargo, la actividad de la cepa *D. hansenii* estudiada,

es menos significativa en la liberación de monoterpenoles, especialmente linalol y geraniol, como previamente describieron Yanai y Sato (1999).

Mendes-Ferreira *et al.* (2001) mostraron que *Kloeckera apiculata* (forma asexual de *H. uvarum*) podría liberar los monoterpenoles de un mosto Moscatel, resultados concordantes con los de este trabajo; esta especie hidrolizó apreciablemente los glicósidos de los óxidos furánicos y piránicos del linalol.

## **5.C. FRACCIONAMIENTO DE LOS PRECURSORES GLICOSILADOS DEL AROMA DE UVAS BLANCAS. HIDRÓLISIS Y TRANSFORMACIÓN POR LA CEPA *S. cerevisiae* UCLMS-1**

### **5.C1. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **5.C1.1. Obtención del mosto**

Para obtener un mosto rico en heterósidos de terpenos así como de norisoprenoides, se recurrió al prensado manual de una muestra de 1,5 Kg de uvas blancas de las variedades Cortese, Sauvignon Blanc y Chardonnay (0,5 Kg de cada una) cosechadas en diferentes viñedos de la Región del Piamonte (Italia) en 1999. Las uvas estuvieron conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Las variedades Cortese y Sauvignon blanc son ricas en heterósidos terpénicos y la Chardonnay en norisoprenoides (Sefton *et al.*, 1993, 1994, Di Stefano *et al.*, 2000).

Por otro lado, las partes sólidas sin granillas se maceraron, en un volumen igual al mosto obtenido, de una solución de ácido tartárico (5 g/L, pH 3,2), durante 24h a temperatura ambiente, con el fin de recuperar los heterósidos de los hollejos, aunque en estas condiciones los glicósidos del nerol, geraniol, y 8-hidroxilinalol, pueden ser parcialmente hidrolizados por las enzimas de la uva. El extracto de los hollejos y el mosto mezclados, se clarificaron, a temperatura ambiente durante 2 h, con una enzima pectinolítica sin actividad glicosidásica residual (Vinozym FCE G, Novo Nordisk).

#### **5.C1.2. Aislamiento y fraccionamiento de glicósidos**

El aislamiento y fraccionamiento de los glicósidos de las uvas, en clases de diferente polaridad (por incremento de los porcentajes de metanol) se realizó según describió Mateo *et al.* (1997). La mezcla del mosto y del extracto de los hollejos, se

pasó a través de un cartucho C18-RP (Waters) de 10 g, previamente activado con metanol y agua.

El cartucho se lavó con agua, los compuestos libres se eluyeron con diclorometano y los glicósidos se recuperaron con metanol.

El extracto metanólico, se evaporó en un rotavapor a vacío y, se recuperó con 5mL de agua y esta solución acuosa, se pasó a través de un cartucho C18-RP de 5 g, previamente activado con metanol y agua. Después de lavar el cartucho con 50mL de agua, los heterósidos se eluyeron secuencialmente con los siguientes solventes:

METANOL-AGUA (20:80 v/v), dos fracciones de 25mL

METANOL-AGUA (30:70 v/v), dos fracciones de 25mL

METANOL-AGUA (40:60 v/v), dos fracciones de 25mL

METANOL, una fracción de 25mL

Estas fracciones se emplearon para conocer los compuestos glicosilados de la clase de los alcoholes terpénicos, de los norisoprenoides y de los bencenoides, presentes en variedades de uva menos aromáticas que la moscatel, mediante hidrólisis enzimática con Pectinol y posterior hidrólisis química, así como la capacidad de la cepa UCLMS-1 para hidrolizarlos.

#### **5.C1.3. Condiciones de cultivo**

Las células se crecieron en el medio descrito en el apartado 5.B1.2 y 10mL de cultivo se utilizaron para obtener de igual manera el pellet de CE y el EAC.

#### **5.C1.4. Hidrólisis de los glicósidos por acción de la levadura**

Cada una de las 7 fracciones se evaporaron en rotavapor, y el residuo así obtenido, se disolvió en 15 mL de tampón citrato-fosfato 0,1M (pH 5,0), dividiéndose en tres alícuotas iguales, una de las cuales se inoculó con las células enteras (CE) de la levadura UCLMS-1, otra con el extracto acetónico celular (EAC) obtenido de ellas y

la tercera parte se conservó como control. Terminada la incubación (35°C/24h), cada alícuota se adicionó con el estándar interno 1-heptanol, se centrifugó para eliminar las células de levadura, y se procedió como en el apartado 5.B1.5.

#### **5.C1.5. Hidrólisis de los glicósidos por enzimas exógenas**

Para liberar las agliconas volátiles mediante hidrólisis enzimática, las 7 fracciones control se trataron con Pectinol (Genencor) y se incubaron a 40°C/24h, procediendo a continuación según Mateo *et al.* (1997).

#### **5.C1.6. Hidrólisis química de los glicósidos**

Para estudiar las posibles transformaciones de los componentes terpénicos y norisoprenoídicos durante el almacenamiento y el envejecimiento de los vinos, tras la hidrólisis enzimática, se realizó la hidrólisis química de las 7 fracciones siguiendo el protocolo propuesto por Di Stefano (1996).

#### **5.C1.7. Cromatografía de Gases- espectrometría de masas**

Las condiciones cromatográficas fueron idénticas a las utilizadas en el capítulo anterior (5.B1.6)



## 5.C2. RESULTADOS

En la **Tabla 5.C.1**, se muestra la concentración de los compuestos bencénicos, terpénicos, norisoprenoides y alcoholes, hidrolizados de los heterósidos de la uva mediante hidrólisis enzimática con Pectinol.

Los compuestos bencénicos eluyeron mayoritariamente en las primeras fracciones, el alcohol bencílico se detectó en todas las fracciones, y el 2-feniletanol en todas excepto en la 1. El guayacol en muy poca cantidad y sólo en la 2, mientras que el benzaldehído se encontró en las fracciones 1 a la 5, el  $\alpha$ -metilbencenometanol y el salicilato de metilo en las 2-4, el 3,4-dimetoxifenol sólo en la 1, el 3,4,5 trimetoxifenol en la 1 y 2 y el cinamaldehído en la 5. El 2,5-dihidroxibenzoato de metilo (indicado por Sefton *et al*, 1994, como derivado del ácido salicílico) se recogió en las 3 primeras fracciones.

Los derivados del 4-hidroxí-3-metoxibenceno como el metilvanillato, el alcohol homovanillico, el zingerone, el dihidroconiferil alcohol, la acetovanillona y la butirovanillona, con la excepción del eugenol y el metoxieugenol, eluyeron principalmente en las 3 primeras fracciones.

Respecto a los compuestos polihidroxilados terpénicos y sus derivados, como los óxidos *cis* y *trans* furánicos del linalol y el 8-hidroxi-dihidrolinalol, se encontraron en las fracciones 5 y 6, la terpina 1 en la 3 y 4 y la terpina 2 en la 2.

Muchos otros compuestos se recogieron en las fracciones intermedias, incluyendo los óxidos *cis* y *trans* piránicos del linalol, los dioles 1 y 2, los *cis* y *trans* 8-hidroxilinalol, el endiol y el p-ment-1-eno-7,8-diol. La diferente polaridad de los óxidos *trans* y *cis* piránicos del linalol se demuestra por la relación obtenida entre sus cantidades, que fue menor que 1 en la fracción 4, y mayor que 1 en la fracción 5. El 2-hidroxi-1,8-cineol se encontró básicamente en la fracción 3, el hidroxigeraniol en la 5 y 6, y los hidroxinerol e hidroxicitronelol sólo en la 5 y 6 respectivamente.

Cuatro terpenos desconocidos (A, B, C y D), aparentemente dos de los cuales son formas isómeras (A y B), se detectaron en las fracciones 5 y 6 y el compuesto E sólo en la 4.

Todos los demás terpenos, linalol, 4-terpineol, neral,  $\alpha$ -terpineol, geranial, citronelol, nerol, geraniol y ácido geránico se encontraron en la última fracción.

Se identificaron los siguientes norisoprenoides, 3-oxo- $\alpha$ -ionol, de la 3 a la 7, 3-hidroxi- $\beta$ -ionona y 3-hidroxi- $\beta$ -damascona, de la 2 a la 6, 5,6-epoxy- $\beta$ -ionona presente sólo en la 2, 3,9-dihidroxi-megastigma-5-ene en la 5 y 6, blumenol C en la 6 y vomifoliol de la 1-5. Se han encontrado otros norisoprenoides desconocidos en las fracciones 5 y 6 (Compuestos W, X, Y) y en la 2 (compuesto Z).

El 1-hexanol se eluyó en las cuatro últimas fracciones, mientras que el *cis*-3-hexen-1-ol y el *trans*-3-hexen-1-ol, en las fracciones intermedias.

En la **Tabla 5.C.2**, se recogen los compuestos identificados tras la hidrólisis química. El anhidrofuranlinalol óxido, el nerol óxido y el hidroxi-trienol se recuperaron en las fracciones 4 y 5; el mircenol sólo en la fracción 5. Al contrario que en la hidrólisis enzimática, se obtuvieron dos valores máximos para los óxidos *trans* y *cis* furánicos del linalol, uno en la fracción 2 y el otro en la 5, debido a la transformación de agliconas polihidroxiladas no volátiles. El óxido *trans* piránico del linalol se encontró en las fracciones 3 y 5, mientras que su isómero se presentó únicamente en la fracción 4.

Los isómeros del 8-hidroxilinalol se transformaron principalmente en compuestos con una intensidad de picos de 94 y 79 u.m.a., presentes principalmente en la fracción 5, aunque también se encontraron en la 4, como el p-ment-1-eno-9-al. En las fracciones 5 y 7 se encontraron muchos derivados de terpenos no identificados.

El ocimenol 1 presente en la 5 y 7 y el ocimenol 2 sólo en la 7, la terpina 1 en las fracciones 3,4 y 7 y la terpina 2 en las 3 y 7.



El  $\alpha$ -terpineol se incrementó en un 66,8% respecto al obtenido en la hidrólisis enzimática, debido a que muchos terpenos se transforman en él durante la hidrólisis química (Williams *et al.*, 1982b) y por ello disminuyó drásticamente la cantidad de geraniol, y de nerol que se redujo hasta niveles por debajo de su umbral de detección.

Las agliconas polihidroxiladas de norisoprenoides generadas mediante hidrólisis química, como el riesling acetal, la damascenona, los dos vitispiranos isómeros, el TDN y el hidrox-TDN se encontraron distribuidos entre las fracciones 3,4 y 5 y de la 2 a la 5 los actinidoles 1 y 2, ambos con un máximo en la fracción 3.

En la **Tabla 5.C.3**, se encuentran los resultados obtenidos al tratar las siete fracciones de precursores con las CE y el EAC de la cepa UCLMS-1, comparados con los del Pectinol.

De ellos se deduce que la levadura estudiada es capaz de liberar algunos de los heterósidos de la uva, generalmente de la fracción en la que se encontraron en mayor cantidad.

La levadura UCLMS-1, liberó algunos compuestos bencénicos como la acetovanillona, el metilvanillato, el zingerone, algunos norisoprenoides, en concreto, el 3-oxo- $\alpha$ -ionol y el vomifoliol y algunos terpenos como el p-ment-1-eno-7,8-diol, el 8-hidroxi-dihidrolinalol, el *cis*-8-hidroxi-linalol, el linalol, el nerol y el geraniol, aunque estos últimos en muy pequeña proporción.

La elevada cantidad de citronelol en la fracción 7 de CE, se debe a que las CE, son capaces de transformar parte del geraniol en citronelol, y de ahí que la cantidad sea superior a la producida por la hidrólisis enzimática con Pectinol y mínima en la tratada con el EAC (Di Stefano, 1992, Dugelay 1992); por lo tanto, el citronelol obtenido fue debido al metabolismo de la levadura más que a la hidrólisis enzimática.

El feniletanol se presentó en elevada concentración en todas las fracciones tratadas con las CE, no ocurriendo lo mismo con el EAC (datos no mostrados), por lo

que este compuesto no fue liberado a partir de sus formas conjugadas, sino que fue deriva del metabolismo de la levadura (Williams *et al.*, 1982b, Zoecklein *et al.*, 1997).

Algunos compuestos como el *trans*-8-hidroxilinalol y el ácido geránico no se pudieron cuantificar, debido a la coelución con grandes cantidades de ácidos grasos procedentes del metabolismo de las levaduras.

Gracias a la utilización de los glicósidos de variedades de uva distintas de la moscatel, se detectaron algunos compuestos no encontrados en esta, como los derivados del 4-hidroxi-3-metoxibenceno muchos de los cuales pudieron ser hidrolizados por la cepa UCLMS-1.

Estos resultados abren una nueva puerta en la interpretación de los procesos que tienen lugar durante la fermentación y prueban la importancia de las levaduras en la liberación de precursores varietales, sugiriendo que éstas podrían influir en la expresión de las características varietales de las uvas.

**Tabla 5.C.1.** Concentración ( $\mu\text{g/kg}$ ) de terpenos <sup>(1)</sup>, norisoprenoides <sup>(2)</sup>, bencenoides <sup>(3)</sup> y alcoholes <sup>(4)</sup> liberados mediante la hidrólisis enzimática con pectinol

Compuestos	Metanol-agua 20:80v/v		Metanol-agua 30:70v/v		Metanol-agua 40:60v/v		Metanol
	Fracciones						
	1	2	3	4	5	6	7
<sup>4</sup> 1-Hexanol	-	-	-	5,0	34,4	15,1	0,8
<sup>4</sup> Cis-3-hexen-1-ol	-	-	5,8	3,8	1,8	-	-
<sup>4</sup> Trans-2-hexen-1-ol	-	-	2,4	5,8	1,8	-	-
<sup>1</sup> Óxido A	-	-	-	1,0	32,3	10,3	-
<sup>1</sup> Óxido B	-	-	-	-	11,7	5,0	-
<sup>3</sup> Benzaldehido	0,8	6,2	4,0	0,5	0,7	-	-
<sup>1</sup> Linalol	-	-	-	-	-	-	55,4
<sup>1</sup> Terpinen-4-ol	-	-	-	-	-	-	0,9
<sup>1</sup> Neral	-	-	-	-	-	-	2,7
<sup>1</sup> $\alpha$ -terpineol	-	-	-	-	-	-	16,8
<sup>1</sup> Geranial	-	-	-	-	-	-	4,0
<sup>1</sup> Compuesto A	-	-	-	-	1,8	1,9	-
<sup>1</sup> Compuesto B	-	-	-	-	1,1	1,6	-
<sup>1</sup> Óxido C	-	-	-	2,4	6,8	0,7	-
<sup>3</sup> Salicilato de metilo	-	8,8	17,1	1,0	-	-	-
<sup>1</sup> Óxido D	-	-	5,0	12,4	0,5	-	-
<sup>1</sup> Citronelol	-	-	-	-	-	-	0,9
<sup>1</sup> Compuesto C	-	-	-	-	7,8	2,6	-
<sup>1</sup> Compuesto D	-	-	-	-	8,2	1,2	-
<sup>1</sup> Nerol	-	-	-	-	-	-	9,6
<sup>3</sup> $\alpha$ -metil-bencenometanol	-	0,5	5,3	1,8	-	-	-
<sup>1</sup> Geraniol	-	-	-	-	-	-	28,8
<sup>3</sup> Guayacol	-	0,8	-	-	-	-	-
<sup>1</sup> 2-Hidroxi-1,8-cineol	-	0,6	11,4	1,9	-	-	-
<sup>3</sup> Alcohol bencílico	15,8	119,6	165,0	1,8	4,3	1,0	2,2
<sup>3</sup> 2-Feniletanol	-	4,3	122,3	50,6	3,9	0,3	0,4
<sup>1</sup> Diol 1	-	-	1,3	17,5	11,1	2,3	0,8
<sup>1</sup> Endiol	-	0,6	-	1,8	3,0	-	-
<sup>3</sup> Cinnamaldehido	-	-	-	-	0,9	-	-
<sup>3</sup> Cresol	-	0,5	-	-	-	-	-
<sup>1</sup> Terpina 1	-	-	7,0	2,5	-	-	-
<sup>1</sup> Diol 2	-	-	-	2,7	2,7	-	-
<sup>3</sup> Eugenol	-	-	-	-	3,1	4,7	0,8
<sup>1</sup> Terpina 2	-	1,4	-	-	-	-	-
<sup>3</sup> 4-vinilguayacol	1,6	6,0	6,7	2,3	0,6	0,4	1,1
<sup>1</sup> Hidroxicitronelol	-	-	-	-	-	2,0	-
<sup>1</sup> 8-Hidroxidihidrolinalol	-	-	-	-	28,9	7,9	-
<sup>2</sup> 5,6-Epoxy- $\beta$ -ionona	-	0,7	-	-	-	-	-
<sup>1</sup> Hidroxinerol	-	-	-	-	3,1	-	-
<sup>1</sup> Trans-8-hidroxilinalol	-	-	-	14,1	46,4	4,1	-
<sup>1</sup> Cis-8-hidroxilinalol	-	-	15,4	160,7	56,4	2,8	-
<sup>1</sup> Hidroxigeraniol	-	-	-	-	7,3	2,4	-
<sup>1</sup> Ácido geránico	-	-	-	-	-	-	5,6
<sup>1</sup> Compuesto E	-	-	-	8,3	-	-	-

Compuestos	Metanol-agua 20:80v/v		Metanol-agua 30:70v/v		Metanol-agua 40:60v/v		Metanol
	Fracciones						
	1	2	3	4	5	6	7
<sup>3</sup> Indol	-	-	-	-	-	2,5	1,9
<sup>3</sup> Ácido benzoico	3,1	2,7	4,1	2,1	-	-	-
<sup>1</sup> p-Ment-1-eno-7,8-diol	-	-	94,9	62,2	2,9	-	-
<sup>2</sup> 3-Hidroxi-β-damascona	-	12,2	11,2	3,3	27,4	7,4	-
<sup>3</sup> Metoxieugenol	-	-	-	-	-	7,5	-
<sup>2</sup> Blumenol C	-	-	-	-	-	12,6	-
<sup>2</sup> Compuesto W	-	-	-	-	6,3	8,2	-
<sup>2</sup> Compuesto X	-	-	-	-	4,8	-	-
<sup>3</sup> Metilvanillato	-	-	7,5	-	-	-	-
<sup>2</sup> 3-Oxo-α-ionol	-	-	4,0	5,1	69,5	31,4	2,1
<sup>2</sup> 3,9-Dihidroxi-megastigma-5-eno	-	-	-	-	8,2	8,9	-
<sup>2</sup> Compuesto Y	-	-	-	-	-	12,6	-
<sup>3</sup> Acetovanillona	2,4	8,1	-	-	-	-	-
<sup>3</sup> 3,4-dimetoxifenol	3,7	-	-	-	-	-	-
<sup>2</sup> 3-Hidroxi-β-ionona	-	4,6	4,0	6,6	18,8	1,9	-
<sup>3</sup> Zingerone	-	3,0	10,1	-	-	-	-
<sup>3</sup> Butirovanillona	-	3,0	-	-	-	-	-
<sup>3</sup> Alcohol homovanillico	8,5	4,8	9,8	-	-	1,1	-
<sup>3</sup> Ácido cinámico	-	-	-	9,2	5,5	-	-
<sup>3</sup> 3,4,5-trimetoxifenol	3,7	5,1	-	-	-	-	-
<sup>2</sup> Compuesto Z	-	7,5	-	-	-	-	-
<sup>3</sup> Dihidroconiferil alcohol	-	-	12,0	5,5	2,6	-	-
<sup>3</sup> 2,5-Dihidroxibenzoato de metilo	3,2	7,1	30,8	-	-	-	-
<sup>3</sup> Vomifoliol	3,4	67,4	67,4	7,1	7,0	-	-

**Óxido A:** *trans*-furanlinalol óxido; **Óxido B:** *cis*-furanlinalol óxido; **Óxido C:** *trans*-piranlinalol óxido; **Óxido D:** *cis*-piranlinalol óxido; **diol 1:** 2,6-dimetil-3,7-octadieno-2,6-diol; **diol 2:** 2,6-dimetil-1,7-octadieno-3,6-diol; **endiol:** 2,6-dimetil-7-octen-2,6-diol; **blumenol C:** 9-hidroxi-megastigma-4-eno-3-ona

**Tabla 5.C.2.** Concentración ( $\mu\text{g/kg}$ ) de terpenos y sus derivados <sup>(1)</sup> y derivados de norisoprenoides <sup>(2)</sup> identificados tras la hidrólisis química.

Compuestos	Metanol-agua 20:80v/v		Metanol-agua 30:70v/v		Metanol-agua 40:60v/v		Metanol
	Fracciones						
	1	2	3	4	5	6	7
<sup>1</sup> Anhidrofuranlinalol óxido	-	-	-	4,5	6,1	-	-
<sup>1</sup> Óxido A	3,9	59,4	17,8	4,7	34,1	9,0	-
<sup>1</sup> Óxido B	-	29,8	11,3	2,4	11,1	4,7	-
<sup>1</sup> Nerol óxido	-	-	-	2,1	4,0	-	-
<sup>2</sup> Vitispirano 1	-	-	7,1	3,9	6,8	-	-
<sup>2</sup> Vitispirano 2	-	-	8,4	5,4	8,3	-	-
<sup>1</sup> Linalol	-	-	-	-	-	-	20,4
<sup>1</sup> Hidroxitrienol	-	-	-	9,0	8,3	-	-
<sup>1</sup> Mircenol	-	-	-	-	3,4	-	-
<sup>2</sup> Riesling acetal	-	-	-	3,3	4,5	-	-
<sup>1</sup> Ocimenol 1	-	-	-	-	7,2	-	2,8
<sup>1</sup> p-Ment-1-eno-9-al	-	-	-	19,3	18,4	-	-
<sup>1</sup> Ocimenol 2	-	-	-	-	-	-	4,1
<sup>1</sup> α-Terpineol	-	-	-	1,6	-	-	50,8
<sup>2</sup> TDN	-	-	-	2,4	2,3	-	-
<sup>1</sup> Óxido C	-	-	7,8	2,6	6,1	-	-
<sup>1</sup> Óxido D	-	-	-	14,8	-	-	-
<sup>2</sup> Damascenona	-	-	-	-	3,8	-	-
<sup>1</sup> Geraniol	-	-	-	-	-	-	2,3
<sup>1</sup> 2-Hidroxi-1,8-cineol	-	-	33,0	-	-	-	-
<sup>2</sup> Actinidol 1	-	15,8	42,5	13,4	1,5	-	-
<sup>2</sup> Actinidol 2	-	20,9	53,9	16,6	2,5	-	-
<sup>1</sup> Diol 1	-	-	-	5,5	4,0	-	-
<sup>1</sup> Endiol	-	-	-	-	12,0	-	18,2
<sup>2</sup> HidroxiTDN	-	-	-	3,1	2,9	-	-
<sup>1</sup> Terpina 1	-	-	14,5	4,2	-	-	38,7
<sup>1</sup> Terpina 2	-	-	6,0	-	-	-	6,9
<sup>1</sup> 8-Hidroxidihidrolinalol	-	-	-	-	9,2	3,7	-
<sup>1</sup> Ácido geránico	-	-	-	-	-	-	2,5

TDN: 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno; Hidroxi-TDN: 6-hidroxi-1,1,6-trimetil-1,2,5,6-tetrahidronaftaleno, anhidrofuranlinalol óxido: 2-metil-2-vinil-5-isopropenil-tetrahidropirano.

**Tabla 5.C.3.** Porcentaje de los compuestos liberados por las células enteras (CE) y del extracto acetónico celular (EAC) de la cepa UCLMS-1, comparada con aquellos obtenidos mediante la hidrólisis enzimática con Pectinol.

Compuestos	Fracción 1		Fracción 2		Fracción 3		Fracción 4		Fracción 5		Fracción 6		Fracción 7	
	CE	EAC	CE	EAC	CE	EAC	CE	EAC	CE	EAC	CE	EAC	CE	EAC
Acetovanillona	100,0	65,0	43,5	44,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vomifoliol	-	-	1,9	6,8	4,4	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5-Dihidroxibenzoato de metilo	-	-	20,8	42,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cis-8-hidroxilinalol	-	-	-	-	6,6	3,9	-	-	3,0	2,8	-	-	-	-
p-Ment-1-eno-7,8 diol	-	-	-	-	3,8	2,8	2,2	4,5	-	-	-	-	-	-
Metil vanillato	-	-	-	-	37,2	38,2	-	-	-	-	-	-	-	-
Zingerone	-	-	-	-	14,3	12,3	-	-	-	-	-	-	-	-
1- Hexanol	-	-	-	-	-	-	10,4	-	3,4	1,3	-	8,4	-	-
8-Hidroxidihidrolinalol	-	-	-	-	-	-	7,5	17,7	3,9	2,7	-	-	-	-
Compuesto E	-	-	-	-	-	-	-	8,2	-	-	-	-	-	-
3-Oxo- $\alpha$ -ionol	-	-	-	-	-	-	-	-	6,2	5,3	13,4	9,3	-	-
Linalol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,8	1,3
Citronelol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	121,7	-
Nerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,3	9,2
Geraniol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,3	6,8

## **CONCLUSIONES GENERALES**

**6. CONCLUSIONES GENERALES**

1) Las especies aisladas en una fermentación vínica espontánea de un mosto blanco e identificadas mediante la técnica PCR-RFLP, fueron, *Candida stellata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* y *guilliermondii* y *Kluyveromyces thermotolerans* y la técnica PCR-TTGE se mostró útil en la diferenciación de estas especies.

2) La caracterización genética directa de las muestras mediante PCR-RFLP y PCR-TTGE, sin el aislamiento previo de las cepas, supone una indudable ventaja respecto a la rapidez, y la posibilidad de poner de manifiesto cepas no *Saccharomyces* presentes en un ecosistema vínico, aunque serán necesarios más estudios para evaluar la reproducibilidad del método y el establecimiento de una base de datos más amplia de las levaduras vínicas para la técnica TTGE.

3) De las 61 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* ensayadas, la cepa UCLMS-39, fue la que mayor actividad mostró en la hidrólisis del ácido poligalacturónico, no siendo necesaria la adición de galacturonatos para incrementar dicha actividad, con un pH óptimo en la región ácida (3,5-5,5), una temperatura óptima de 50°C y afectada únicamente por la presencia de etanol en el medio.

4) No todas las cepas estudiadas pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, poseían el gen estructural *PGU1*, aunque sí la mayoría de ellas, de las cuales no todas hidrolizaron el APG en las condiciones ensayadas, por lo que podrían tener un promotor inactivo del gen, una secuencia no funcional del gen o que expresaran modificaciones post-transcripcionales.

5) El gen *PGU1* de la cepa UCLMS-39, fue activo bajo su propio promotor, el promotor *GAL1* y el promotor *PGK1*; su secuencia contenía una mutación en el nucleótido 877 (A→G) que le confería el cambio de un aminoácido (Ser<sup>293</sup>→Gly) de los 361 que constituían la proteína, comparada con la encontrada en la base de datos.



**6)** La integración dirigida al locus *ILV2* de la construcción *pPGK1-PGU1*, promotor y gen de origen *S. cerevisiae* UCLMS-39, permitió la obtención de la cepa UCLMS-1M modificada genéticamente, no transgénica, con una gran capacidad hidrolítica sobre APG.

**7)** Cuando la cepa UCLMS-1M se utilizó en el proceso de vinificación, utilizando técnicas de maceración, se obtuvo un gran incremento en la extracción del semifermentado y una mayor intensidad colorante del vino tinto obtenido. No obstante, las modificaciones en el contenido en polisacáridos pécticos no tienen ninguna consecuencia directa en el gusto o el sabor de los vinos. El impacto principal de pectinasas en la vinificación es debido a la mejora de las técnicas de procesado de uva.

**8)** Este estudio mostró que la cepa *S. cerevisiae* UCLMS-39, aislada de un ecosistema vínico puede romper los enlaces  $\beta$ -glucosídicos de algunos de los sustratos sintéticos probados y dependiendo de las condiciones de crecimiento.

**9)** Las levaduras vínicas tienen actividades glicosidásicas capaces de causar la liberación de compuestos del aroma, a partir de sus formas conjugadas no volátiles y por lo tanto inodoras. De las cepas vínicas estudiadas *H. uvarum* mostró la mayor capacidad para hidrolizarlas.

**10)** El método de fraccionamiento utilizado permitió conocer los compuestos glicosilados de variedades de uvas blancas, Chardonnay, Cortese y Sauvignon blanc. La cepa UCLMS-1, liberó algunos compuestos bencénicos como la acetovanillona, el metilvanillato, el zingerone, algunos norisoprenoides (3-oxo- $\alpha$ -ionol y vomifoliol), y algunos terpenos (p-ment-1-eno-7,8-diol, 8-hidroxidihidrolinalol, *cis*-8-hidroxilinalol, linalol, nerol, geraniol).

**11)** Estos resultados abren una nueva puerta en la interpretación de los procesos que tienen lugar durante la fermentación y prueban la importancia de las levaduras en la liberación de precursores del aroma, sugiriendo que éstas podrían influir en la expresión de las características varietales de las uvas.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Adams M.D. *et al.* (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Nature. 404, 502-506
- 2) Adam, A. y Polaina J. (1991). Construction of a *Saccharomyces cerevisiae* strain able to ferment cellobiose. Curr. Genet. 20, 5-8.
- 3) Armand, S., Wagemaker, M.J.M., Kester, H.C.M., Sanchez-Torres, P., van Santen, Y., Dijkstra, B.W., Visser, J. y Benen, J.A.E. (2000). The active-site topology of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase II as studied by site-directed mutagenesis. J. Biol. Chem. 275, 691-696.
- 4) Aryan, A.P., Wilson, B., Strauss C.R. y William, P.J. (1987). The properties of glycosidases of *Vitis vinifera* and a comparison of their  $\beta$ -glucosidase activity with that of exogenous enzymes. An assessment of possible application in enology. Am. J. Enol. Vitic. 38, 182-188.
- 5) Aspinall, G.O. (1980). Chemistry of cell walls polysaccharides. En, the biochemistry of plants. A comprehensive treatise (J. Preiss, ed.), vol III, pp. 473-500. Academic Press. N. York.
- 6) Baek, H.H. y Cadwallader, K.R. (1999). Contribution of free and glycosidically bound volatile compounds to the aroma of muscadine grape juice. J. Food Sci. 3, 441-444.
- 7) Baleiras Couto, M.M., Vogels, J., Hofstra H., Huis in't Veld, J.H.J. y van der Vossen, J.M.B.M. (1995). Random amplified polymorphic DNA and restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA in taxonomy, two identification techniques for food-borne yeast. J. Appl. Bacteriol. 79, 525-535.
- 8) Baleiras Couto, M.M., Eijssma, B., Hofstra, H., Huis in't Veld J.H y Van der Vossen J.M. (1996). Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. Appl. Environ. Microbiol. 62, 41-46.
- 9) Barnett, J.A., Payne, R.W. y Yarrow, D. (1990). Yeast, Characteristics and identification, Second edition edn. Cambridge University Press
- 10) Barnett, J.A., Payne, R.W. y Yarrow, D. (2000). Yeast, Characteristics and Identification, 3rd Edition. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-1139.
- 11) Bayonove C., Gunata Z. y Cordonnier R. (1984). Mise en evidence de l'intervention des enzymes dans le developpement de l'arome du jus de muscat avant fermentation, la production de terpenols. Bull. OIV. 643, 741-748.
- 12) Birnboim, H.C. y Dolly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic. Acids Res. 7, 1513-1523.

- 13) Blanco, P., Sieiro, C., Díaz, A. y Villa, T.G. (1994). Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. Can. J. Microbiol. 40, 974-977.
- 14) Blanco P., Sieiro C., Díaz A., Reboredo M. y Villa T.G. (1997). Grape juice biodegradation by polygalacturonases from *Saccharomyces cerevisiae*. Int. Biodeterior. Biodegrad. 40, 115-118.
- 15) Blanco, P., Sieiro, C., Reboredo, N.M. y Villa, T.G. (1998). Cloning, molecular characterization, and expression of an endo-polygalacturonase-encoding gene from *Saccharomyces cerevisiae* IM1-8b. FEMS Microbiol. Lett. 164, 249-55
- 16) Blanco, P., Sieiro, C. y Villa, T. G. (1999). Production of pectic enzymes in yeasts. FEMS Microbiol. Lett. 175, 1-9.
- 17) Blom, H. (1983). Partial characterization of thermostable anthocyanin- $\beta$ -D-glucosidase from *Aspergillus niger*. Food Chemistry. 12. 197-204
- 18) Brillouet J.M. (1987). A study of pectic polysaccharides in must from various mature grapes grown in the Pech Rouge experimental vineyard. Biochimie, 69, 713-721.
- 19) Briones, A., Úbeda, J. y Grando, S. (1996). Differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from fermenting must according to their karyotype patterns. Int. J. Food Microbiol. 28, 369-377.
- 20) Casey, G.P., Xiao, W. y Rank, G.H. (1988). A convenient dominant selectable marker for gene transfer in industrial strains of *Saccharomyces* yeast: *SMR1* encoded resistance to the herbicide sulfometuron methyl. J. Inst. Brew. 94, 93-97.
- 21) Ciani, M. y Picciotti, G. (1995). The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. Biotechnol. Letts. 17, 1247-1250.
- 22) Cocolin, L., Bisson, L.F. y Mills, D.A. (2000a). Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. FEMS Microbiol. Lett. 189, 81-87.
- 23) Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C. y Comi, G. (2000b). Development of a rapid method for the identification of *Lactobacillus* spp. isolated from naturally fermented italian sausages using a polymerase chain reaction-temperature gradient gel electrophoresis. Lett. Appl. Microbiol. 30, 126-9.
- 24) Cordonnier, R. y Bayonove, C. (1974). Mise en évidence dans la baie de raisin, variété muscat d'Alexandrie, de monoterpènes liés révélables par une ou plusieurs enzyme du fruit. C.R. Acad. Sci. Paris, Serie D. 178, 3387-3390.

- 25) Cordonnier, R.E., Gunata, Y.Z., Baumes, R.L. y Bayonove, C.L. (1989). Recherche d'un matériel enzymatique adapté a l'hydrolyse des précurseurs d'arôme de nature glycosidique du raisin. *Conn. Vig. Vin.* 23, 7-23.
- 26) Crous, J.M., Pretorius, I.S. y van Zyl, W.H. (1995). Cloning and expression of an *Aspergillus kawachii* endo-1,4-beta-xylanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 28, 467-73
- 27) Charoenchai, C., Fleet, G.H., Henschke, P.A. y Todd, B.E.N. (1997). Screening of non-*Saccharomyces* wine yeast for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Aust. J. Grape Wine Res.* 3, 2-8
- 28) Darriet, D., Boldron, J. N. y Dubourdieu, D. (1988). L'hydrolyse des heterosides terpeniques du muscat a petits grains par les enzymes periplasmiques de *Saccharomyces cerevisiae*. *Conn. Vig. Vin.* 22, 189-195.
- 29) De Vries, J.A., Den Uijl, Voragen, C.H., Rombouts, F.M. y Pilnik, W. (1983). Structural Features of the Neutral Sugar Chains of Apples Pectic Substances. *Carbohydr. Polym.* 3, 193-205.
- 30) Delcroix, A., Günata, Z., Sapis, J.C., Salmon, J.M. y Bayonove, C. (1994). Glycosidase activities of three enological yeast strains during winemaking, effect on the terpenol content of Muscat wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 45, 291-296.
- 31) Di Stefano, R. (1982). Presenza di precursori del linalolo nel Moscato bianco del Piemonte. *Vignevini.* 9, 45-47.
- 32) Di Stefano, R. (1991). Proposition d'une methode de preparation de l'echantillon pour la determination des terpenes libres et glycosides des raisins et des vins. *Bull. O.I.V.* 64, 721-725.
- 33) Di Stefano R. (1996). Metodi chimici nella caratterizzazione varietale. *Annali. Ist. Sper. Enol.* 33-53.
- 34) Di Stefano, R., Maggiorotto, C. y Cianotti S. (1992). Trasformazioni di Nerolo e Geraniolo indotte da lieviti. *Riv. Vitic. Enol.* 1, 43-49.
- 35) Di Stefano, R., Gentilini, N. y Ummarino, I. (2000). Studio dei profili aromatici di varietà fruto bianco coltivate nella zona del Collio. *L'Enologo.* 12, 95-102.
- 36) Doco, T., Brillouet, J.M. y Moutounet, M. (1996). Evolution of grape (Cardignan noir cv.) and yeast polysaccharides during fermentation and post-maceration. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 108-110.
- 37) Doco, T., Williams, P., Vidal, S. y Pellerin, P. (1997). Rhamnogalacturonan-II, a dominant polysaccharide in juices produced by enzymatic liquefaction of fruits and vegetables. *Carbohydr. Res.* 297, 89-94.

- 38) Dubordieu, D.P., Darriet, P., Chatonnet, F. y Boidron, J.M. (1989). Intervents de systèmes enzymatiques de *Saccharomyces cerevisiae* sur certains précurseurs d'arômes du raisin. In, P. Ribèreau-Gayon, A. Lonvaud. (Eds.). Proceedings of the Fourth International Enology Symposium Activités Oenologiques, Dunod, Bordeaux, Paris, p. 151–159.
- 39) Dugelay, I., Gunata, Z., Sapis, J.C., Baumes, R. y Bayonove, C. (1992). Etude de l'origine du citronellol dans le vins. J. Int. Sci. Vig. Vin. 26. 177-184.
- 40) Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. y Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Int. J. Syst. Bacteriol. 49, 329-337.
- 41) Falco, S.C., Dumas, K.S. y Livak, K.J. (1985). Nucleotide sequence of the yeast ILV2 gene which encodes acetolactate synthase. Nucleic Acids Res. 13. 4011-4027.
- 42) Federici, F. (1985). Production, purification and partial characterisation of an endopolygalacturonase from *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. Antonie van Leeuwenhoek. 51, 139–150.
- 43) Felske, A., Vancanneyt, M., Kersters, K. y Akkermans, A.D. (1999). Application of temperature-gradient gel electrophoresis in taxonomy of coryneform bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 49. 113-121.
- 44) Fernández, M.T. (1998). Estudio de la biota no *Saccharomyces* de mostos en fermentación. Métodos clásicos y moleculares (PCR). Tesina de Licenciatura. Universidad de Castilla la Mancha.
- 45) Fernández, M. (1999). Caracterización genética de levaduras no *Saccharomyces* con propiedades enzimáticas de interés enológico. Tesina de Licenciatura. Universidad de Castilla la Mancha.
- 46) Fernández, M.T., Úbeda, J.F. y Briones, A.I. (1999). Comparative study of non-*Saccharomyces* microflora of musts in fermentation, by physiological and molecular methods. FEMS Microbiol. Lett. 173, 223-229.
- 47) Fernández, M., Úbeda, J.F. y Briones, A.I. (2000). Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. Int. J. Food Microbiol. 59, 29-36.
- 48) Fernández-Espinar, M. T., Esteve-Zarzoso B., Querol, A. y Barrio, E. (2000). RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*, a fast methods for species identification and the differentiation of flor yeast. Antonie van Leeuwenhoek. 78, 87-97.

- 49) Fernández-González M., Espinosa, J.C., Úbeda, J.F. y Briones, A.I. (2001). Yeasts present during wine fermentation, Comparative analysis of conventional plating and PCR-TTGE. *Syst Appl Microbiol.* 24, 639-644.
- 50) Fernández-González, M., Di Stefano, R. y Briones, A.I. (2003). Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from muscat must by different yeast species. *Food Microbiol.* 20, 35-41.
- 51) Fischer, R.L. y Bennett, A.B. (1991). Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 675-703.
- 52) Fleet G.H y Heard, G.M. (1993) Yeast-growth during fermentation. In wine microbiology and biotechnology. Ed. Fleet, G.H. Harwood Academic Publishers GmbH. 27-54.
- 53) Fleischmann, R.D. *et al.* (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science.* 269, 496-512.
- 54) Gainvors, A., Frazier, V., Lemaesquier, H., Lequart, C., Aigle, M. y Belarbi, A. (1994a). Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast.* 10, 1311-9.
- 55) Gainvors, A., Karam, N., Lequart, C. y Belarbi, A. (1994b) Use of *Saccharomyces cerevisiae* for the clarification of fruit juices. *Biotechnol. Lett.* 16, 1329–1334.
- 56) Gainvors, A. y Belarbi, A. (1995). Detection method for polygalacturonase-producing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 15, 1493-1499.
- 57) Gainvors, A., Nedjaoum, N., Gognies, S., Muzart, M., Nedjma, M. y Belarbi, A. (2000). Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGL1-1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 183, 131-135.
- 58) Gasent-Ramirez, J.M., Codón, A.C. y Benítez, T. (1995). Characterization of genetically transformed *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast able to metabolize melobiose. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2113-2121.
- 59) Gietz R.D. y Shiestl R.H. (1995). Transforming yeast with DNA. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5, 255-269.
- 60) Glories, Y. (1984). La couleur des vins. 2e partie. *Conn. Vig. Vin.* 18,253-271.
- 61) Goffeau, A. *et al.* (1997). The Yeast Genome Directory. *Nature* 387. (Suppl.), 5–105.
- 62) Gognies, S., Gainvors, A., Aigle, M. y Belarbi, A. (1999). Cloning, sequence analysis and overexpression of a *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase-encoding gene (*PGL1*). *Yeast.* 15, 11-22.



- 63) Gognies S., Simon, G. y Belarbi, A. (2001). Regulation of the expression of endopolygalacturonase gene *PGU1* in *Saccharomyces*. *Yeast* 18, 423-432.
- 64) González San José, M.L., Izcara, E., Pérez-Magariño, S. y Revilla, I. (1998). Modification of red wine colour using pectolytic enzymes. The 2nd international electronic conference on synthetic organic chemistry. September 1-30. <http://www.mdpi.org/ecsoc/>.
- 65) González, L.M. y González Lara, R. (1994). A selective separation of alcoholic beverages and distillates wines by CG. *J Chromatogr Sci.* 32, 195-198.
- 66) González-Candelas, L., Cortell, A. y Ramon, D. (1995). Construction of a recombinant wine yeast strain expressing a fungal pectate lyase gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 126, 263-270.
- 67) González Techera, A., Jubany, S., Carrau, F.M., y Gaggero, C. (2001). Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers. *Lett. Appl. Microbiol.* 33. 71-75.
- 68) Grando, S., Ubeda, J.F. y Briones, A.I. (1994). RAPD analysis of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains differentiated by pulsed field gel electrophoresis. *Biotechnol. Tech.* 8, 557-560.
- 69) Guillamón, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J. y Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal ITS region. *Arch. Microbiol.* 169, 387-392.
- 70) Gunata, Z., Bayonove, C., Baumes R.L. y Cordonnier, R. (1986). Stability of free and bound fractions of some aroma components of grapes cv. Muscat during wine processing, preliminary results. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 112-114.
- 71) Gunata, Y. Z, Bitteur, S., Brillouet, J. M., Bayonove, C. L. y Cordonnier, R. (1988). Sequential enzymatic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydr. Res.* 184, 139-149.
- 72) Gunata Y.Z, Bayonove C.L., Tapiero C. y Cordonnier R. (1990a). Hidrolysis of grape monoterpenil  $\beta$ -D-glucosides by various  $\beta$ -glucosidases. *J. Agr. Food Chem.* 38, 1232-1236.
- 73) Gunata, Y. Z, Bayonove, C. L., Cordonnier, R. E., Arnaud, A. y Galzy, P. (1990b). Hidrolysis of grape monoterpenil glycosides by *Candida molischiana* and *Candida wickerhamii*  $\beta$ -glucosidase. *J. Sci. Food Agric.* 50, 499-506.
- 74) Gunata, Z., Blondeel, C., Vallier, M. J., Lepoutre, J. P., Sapis, J.C. y Watanabe, N. (1998). An endoglycosidase from grape berry skin of cv. m. Alexandria. Hydrolyzing potentially aromatic disaccharide glycosides. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2748-2753.

- 75) Hernández, L. F., Espinosa, J. C., Fernández-González, M. y Briones, A. (2002).  $\beta$ -glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 171-176.
- 76) Hernán-Gómez, S., Espinosa J.C. y Úbeda, J.F. (2000). Characterization of wine yeasts by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. (TGGE). *FEMS Microbiol. Lett.* 193,45-50.
- 77) Hirose, N., Kishida, M., Kawasaki, H. y Sakai, T. (1998). Molecular cloning and expression of a polygalacturonase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* 86, 332–334.
- 78) Hoffman, C.S. y Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.* 57, 267- 272.
- 79) Holt, R.A. *et al.* (2002). The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science.*, 298, 129-149.
- 80) Huang, H.T. (1955). Decolorization of anthocyanins by fungal enzymes. *Agric. Food Chem.* 3, 141-146.
- 81) Iguchi, K., Hirano, H., Kishida, M., Kawasaki, H. y Sakai, T. (1997). Cloning of a protopectinase gene of *Trichosporon penicillatum* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.* 143,1657-64.
- 82) Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 96, 23-8.
- 83) Izquierdo, P.M. (1996). Caracterización genética y estudio de las propiedades enológicas y enzimáticas de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas en bodegas de la D.O. Valdepeñas. Tesis Doctoral. Universidad de Castilla la Mancha.
- 84) Izquierdo, P. M., Úbeda, J. F. y Briones, A. I. (1997). Study of the karyotype of wine yeasts isolated in the region of Valdepeñas in two consecutive vintages. *Food Microbiol.* 14, 221-225.
- 85) James, S.A., Cai, J., Roberts, I.N. y Collins, M.D. (1997). A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences, description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 2, 453-460.
- 86) Jia, J. y Wheals, A.E. (2000). Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 38, 264-270.
- 87) Kato, Y. y Nevins, D.J. (1983). Structure of the arabinogalactan from zea shoots. *Plant Physiol.* 74, 562-568.

- 88) Keegstra, K., Talmadge, K.W., Bauer, W.D. y Albersheim, P. (1973). The structure of plant cell walls. II. A Model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiol.* 51, 188-187.
- 89) Kingsman, S.M., Cousens, D., Stanway, C.A., Chambers, A., Wilson, M. y Kingsman, A.J. (1990). High-efficiency yeast expression vectors based on the promoter of the phosphoglycerate kinase gene. *Methods Enzymol.* 185, 329-341.
- 90) Kreger-Van Rij, N.J.W. (1984). *The yeast, a taxonomic study*. Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam.
- 91) Kurtzman, C. P. y Fell, J. W. (1998). *The yeast , A taxonomic study*, 4th edn. Elsevier Science.
- 92) Laidlaw, T.A., Tompkins, T.A., Savard, L. y Dowhanick, T.M. (1996). Identification and differentiation of brewing yeast using specific and RAPD Polymerase Chain Reaction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 54, 97-102.
- 93) Laing, E. y Pretorius, I. S. (1992). Synthesis and secretion of an *Erwinia chrysanthemi* pectate lyase in *Saccharomyces cerevisiae* regulated by different combinations of bacterial and yeast promoter and signal sequences. *Gene.* 121, 35-45.
- 94) Laing, E. y Pretorius, I.S. (1993). Co-expression of an *Erwinia chrisantemi* pectate lyase-encoding gene (*peIE*) and *E. carotovora* polygalacturonase-encoding gene (*peh1*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39, 181-188
- 95) Lander, E.S. *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860-921.
- 96) Lang, C. y Looman A.C. (1995). Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 147-156
- 97) Lecas, M., Gunata, Z., Sapis, J.C., Bayonove, C. (1991). Purification and partial characterization of  $\beta$ -glucosidase from grapes. *Phytochem.* 30, 451-454
- 98) Lilly, M., Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S. (2000). Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66,744-53.
- 99) Lodder, J. (1970). *The yeast. A taxonomic study*. North Holland Publishing Company, Amsterdam.
- 100) Lodder, J. y Kreger-Van Rij, N.J.W. (1967). *The yeast. A taxonomic study*. North Holland Publishing Company, Amsterdam.
- 101) Manzanares, P., Rojas, V., Genovés S. y Vallés, S. (2000). A preliminary search

- for anthocyanin- $\beta$ -D-glucosidase activity in non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Int. J. Food Sci. Technol.* 35, 95-103.
- 102) Marín, D., Jiménez, A. y Fernandez Lobato M. (2001). Construction of an efficient amylolytic industrial yeast strain containing DNA exclusively derived from yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* 201, 249-255.
- 103) Masneuf, I., Aigle, M. y Dubourdieu D. (1996). Development of a polymerase chain/restriction fragment length polymorphism method for *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* identification in enology. *FEMS Microbiol. Lett.* 138, 239-244.
- 104) Mateo J.J., Gentilini N., Huerta T., Jiménez M. y Di Stefano R. (1997). Fractionation of glycoside precursors of aroma in grapes and wine. *J. Chromatogr. A* 778, 219-24.
- 105) Mateo, J. J. y Di Stefano, R. (1997). Description of the  $\beta$ -glucosidase activity of wine yeasts. *Food Microbiol.* 14, 583-591.
- 106) McKay, A.M. (1988). A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion. *FEMS Microbiol. Lett.* 56, 355-358.
- 107) McKay, A.M. (1990). Degradation of polygalacturonic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiol.* 11, 41-44.
- 108) McNeil, M., Darvill, A.G., Albersheim, P. (1982). Structure of plant cell walls. XII. Identification of seven differently linked glycosyl residues attached to O-4 of the 2,4 linked L-rhamnosyl residues of rhamnogalacturonan I. *Plant Physiol.* 70, 1586-1591.
- 109) McNeil, M., Darvill, A.G., Fry, S.C. y Albersheim, P. (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 625-663.
- 110) Mendes-Ferreira, A., Clímaco, M.C., y Mendes Faia, A. (2001). The role of non-*Saccharomyces* species in realising glycosidic fracción of grape aroma components- a preliminary study. *J. Appl. Microbiol.* 91, 67-71.
- 111) Messner, R. y Prillinger, H. (1995). *Saccharomyces* species assignment by long range ribotyping. *Antonie van Leeuwenhoek.* 67, 363-370.
- 112) Milner, Y. y Avignad, G. (1967). A copper reagent for determination of hexuronic acids and certain ketohexoses. *Carbohydr. Res.* 4, 359-361
- 113) Molnar, O., Messner, R., Prillinger, H., Stahl, U. y Slavikova, E. (1995). Genotypic identification of *Saccharomyces* species using random amplified polymorphic DNA analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* 18, 136-145.

- 114) Murray, A. E., Hollibaugh, J. T. y Orrego, C. (1996). Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient electrophoresis of 16 S rDNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2676-2680.
- 115) Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C. O. y Jannasch, H. W. (1995). Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16 S rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* 164, 165-171.
- 116) Muyzer, G. y Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TTGE). In microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73, 127-141.
- 117) Nadal, D., Colomer, B. y Piña, B. (1996). Molecular polymorphism distribution in phenotypically distinct populations of wine yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 6, 1944-1950.
- 118) Naumov, G. I., Naumova, E. S., Aigle, M., Masneuf, I. y Belarbi, A. (2001) Genetic reidentification of the pectinolytic yeast strain SCPP as *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 108-111.
- 119) Nebreda, A.G., Villa, T.G., Villanueva, J.R. y Rey, F. (1986). Cloning of genes related to exo-beta glucanase production in *Saccharomyces cerevisiae*, characterization of an exo-beta glucanase structural gene. *Gene* 47, 245-259.
- 120) Oackley-Gutowski, K.M., Hathorne, B.D. y Kavanagh, T.E. (1992). Application of chromosome fingerprinting to the differentiation of brewing yeast. *J ASBC*. 50, 48-52.
- 121) Pellerin, P. (2001). Pectic polysaccharides from grape berry cell walls, Influence of endogenous and commercial pectinases on wine-making processes and on the final composition and quality of wines. In *Pectins and pectinases. An international symposium to be held in Rotterdam, The Netherlands. May 6-10*.
- 122) Perez, M.A., Gallego, F.J. e Hidalgo, P. (2001). Evaluation of molecular techniques for the genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 205, 375-8.
- 123) Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium, novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*. 16, 675-729.
- 124) Puvanesarajah V., Darvill A.G. y Albersheim, P. (1991). Structural characterization of two oligosaccharide fragments formed by the selective cleavage of rhamnogalacturonan II, evidence for the anomeric configuration and attachment sites of apiose and 3-deoxy-2-heptulosaric acid. *Carbohydr. Res.* 218, 211-222.
- 125) Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. y Ramón, D. (1992a). Molecular monitoring of

wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2948-2953.

126) Querol, A., Barrio, E. y Ramón, D. (1992b). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 439-446.

127) Querol, A. y Ramón, D. (1996). The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends Food Sci. Technol.* 7, 73-78.

128) Riou, C., Salmon, J.M., Vallier, M.J., Gunata, Z. y Barre, P. (1998). Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3607-3614.

129) Rogerson, F.S.S., Vale, E., Grande, H.J. y Silva, M.C.M. (2000). Alternative processing of port-wine using pectolytic enzymes. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 2, 222-227.

130) Rose, M.D., Winston, F. y Hieter, P. (1990). *Methods in yeast genetics, a laboratory course manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. NY. 131-132.

131) Rosi, I., Vinella, M. y Domizio, P. (1994). Characterization of  $\beta$ -glucosidase activity in yeast of oenological origin. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 519-527.

132) Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring.

133) Sánchez-Torres, P., González-Candelas, L. y Ramón, D. (1998). Heterologous expression of a *Candida molischiana* anthocyanin- $\beta$ -glucosidase in a wine yeast strain. *J. Agric. Food Chem.* 46, 354-360.

134) Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463-5467.

135) Sato, M., Watari, J., Sahara, H., y Koshino, S. (1994). Instability in electrophoretic karyotype of brewing yeasts. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 52, 148-151.

136) Saulnier L. y Thibault. J.F. (1987). Enzymatic degradation of isolated pectic substances from the pulp of grape berries. *Carbohydr. Polym.* 7, 345-360.

137) Saulnier L. y Brillouet J.M. (1989). An arabinogalactan-protein from the pulp of grapes berries. *Carbohydr Res.* 188, 137-164.

138) Saulnier L., Brillouet J.M., Moutounet M., Hevé du Penhoat C. y Michon V. (1992). New investigations of the structure of grape arabinogalactan-protein. *Carbohydr. Res.* 224, 219-235.

139) Sefton M.A., Francis J.L. y Williams P.J. (1993). The volatile composition of Chardonnay juice, a study by flavor precursor analysis. *Am. J. Vitic. Enol.* 44, 359-371.

- 140) Sefton M.A., Francis J.L. y Williams P.J. (1994). Free and bound volatile secondary metabolites of *Vitis vinifera* grape cv. Sauvignon Blanc. J. Food Sci. 59, 142-147.
- 141) Servili, M., Begliomini, A. L. y Montedoro, G. (1992). Utilization of a yeast pectinase in olive oil extraction and red wine making processes. J. Sci. Food Agric. 58, 253-260.
- 142) Sims, C.A., Johnson, R.P. y Bates, R.P. (1988). Response of a hard-to-press *Vitis rotundifolia* cultivar and a hard-to-clarify *Euvitis* hybrid to commercial enzyme preparations. Am. J. Enol. Vitic. 39, 341-343.
- 143) Smole Mozina, S., Dlačny, D., Deak, T. y Raspor, P. (1997). Identification of *Saccharomyces sensu stricto* and *Torulaspora* yeast by PCR ribotyping. Lett. Appl. Microbiol. 24, 311-315.
- 144) Southern, E.M. (1995). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517.
- 145) Spellman, M.W., McNeil, M., Darvill, A.G. y Albersheim, P. (1983). Characterization of a structurally complex heptasaccharides isolated from the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. Carbohydr. Res. 122, 131-153.
- 146) Strauss, M. L. A., Jolly, N. P. Lambrechts, M. G. y van Rensburg, P. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. J. Appl. Microbiol. 91, 182-190.
- 147) Sudraud, P. (1958). Interpretation des courbes d'absorption des vins rouges. Ann. Technol. Agric. 7, 203-208.
- 148) Takayanagi, T., Uchibori, T. y Yokotsuka, K. (2001). Characteristics of yeast polygalacturonases induced during fermentation on grape skins. Am. J. Enol. Vitic. 52, 41-44.
- 149) Templeton, M.D., Sharrock, K.R., Bowen, J.K., Crowhurst, R.N. y Rikkerink, E.H.A. (1994). The pectin lyase-encoding gene (pnl) family from *Glomerella cingulata*, characterization of *pnlA* and its expression in yeasts. Gene. 142, 141-146.
- 150) The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature. 408, 796-815.
- 151) Úbeda, J., y Briones, A. (2000). Characterization of differences in the formation of volatiles during fermentation within synthetic and grape must by wild *Saccharomyces* strains. Lebensm wiss u Technol. 33, 408-414.
- 152) Úbeda, J.F. (1995). Selección sistemática de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de interés en enología. Tesis doctoral. Universidad de Castilla la Mancha.

- 153) Valente, P., Gouveia, F.C., de Lemos, G.A., Pimentel, D., van Elsas, J.D., Mendonça-Hagler, L.C. y Hagler, A.N. (1996). PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. FEMS Microbiol. Lett. 137, 253-256.
- 154) Van Rensburg, P. y Pretorius. I.S. (2000). Enzymes in winemaking, harnessing natural catalyst for efficient biotransformations – a review. S. Afr. J. Enol. Vitic. 21, 52-73.
- 155) Vasserot, Y., Chermardin, P., Arnaud A. y Galzy, P. (1989). Purification and properties of a  $\beta$ -glucosidase of *Hanseniaspora vinea* van der walt with the view to its utilization in fruit aroma liberation. J. Appl. Bacteriol. 66, 271-279.
- 156) Vaughan-Martini, A. (1995). *Saccharomyces barnettii* and *Saccharomyces spencerum*, two new species of *Saccharomyces sensu lato*. Antonie van Leeuwenhoek. 68, 111-118.
- 157) Vaughan-Martini, A. y Martini, A. (1987). Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. Antonie van Leeuwenhoek. 53, 77-84.
- 158) Vaughan-Martini, A. y Pollacci, P. (1996). Synonym of the yeast genera *Saccharomyces meyen ex hansen* and *Pachytichospora* van der Walt. Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 318-320.
- 159) Vaughan-Martini, A., Barcaccia, S. y Pollacci, P. (1996). *Saccharomyces rosinii* sp. nov., a new species of *Saccharomyces sensu lato* van der Walt. Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 615-618.
- 160) Vidal, S., Doco, T., Williams, P., Pellerin, P., York, W.S., O'Neill, M.A., Glushka, J., Darvill, A.G. y Albersheim, P. (2000). Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II, evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. Carbohydr. Res. 326, 277-294.
- 161) Vilanova, M., Blanco, P., Cortes, S., Castro, M., Villa, T.G. y Sieiro, C. (2000). Use of a *PGU1* recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain in oenological fermentations. J. Appl. Microbiol. 89, 876-883.
- 162) Villetaz, J.C. (1990) Les colloïdes colmatant et la filtration des vins. Revue Française d'œnologie, 122,59-63.
- 163) Villetaz, J.C. (1996). Utilisation des enzymes en œnologie pour l'extraction de la couleur et por l'extraction et la revelation des arômes. Bull. OIV. 787, 843-869.
- 164) Voirin, S., Baumes, R., Bitteur, S., Gunata, Z. y Bayonove C. (1990). Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes. J. Agric.Food Chem. 38, 1373-1378.



- 165) Westhuizen, T.J. y Pretorius I.S. (1992). The value of electrophoretic fingerprinting and karyotyping in wine yeast breeding programmes. *Antonie van Leeuwenhoek*. 61, 249-257.
- 166) Whitaker, J.R. (1984). Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. *Enzyme Microb. Technol.* 6, 341-349.
- 167) White, T. J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. 315-322.
- 168) Williams, P.I., Strauss, C.R. y Wilson, B. (1981). Classification of the monoterpenoid composition of Muscat grapes. *Am. J. Enol Vitic.* 32, 230-235.
- 169) Williams, P. J., Strauss, G. R., Wilson, B. y Massy-Westropp, R. A. (1982a). Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochem.* 21, 2013-2020.
- 170) Williams, P.J., Strauss, C. R., Wilson, B. y Massy-Westropp, R. A. (1982b). Studies on the hydrolysis of *Vitis Vinifera* monoterpene precursor compounds and model monoterpene  $\beta$ -D-glucosides rationalizing the monoterpene composition of grapes. *J Agr Food Chem.* 30, 1219-1223.
- 171) Wood, C.R., Boss, M.A., Kenten, J.H., Calvert, J.E., Roberts, N.A. y Emtage, J.S. (1985). The synthesis and in vivo assembly of functional antibodies in yeast. *Nature*. 314, 446-449.
- 172) Wrosted, R.E., Wightman, J.D. y Durst, R.W. (1994). Glycosidase activity of enzyme preparations used in fruit juice processing. *Food Technol.* 11, 90-98.
- 173) Yanai, T. y Sato, M. (1999). Isolation and properties of  $\beta$ -glucosidase produced by *Debaryomyces hansenii* and its application in winemaking. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 231-235.
- 174) Yáñez, E., Carmona, T.A., Tiemblo, M., Jiménez, A. y Fernandez-Lobato, M. (1998). Expression of the *Schwanniomyces occidentalis* SWA2 amylase in *Saccharomyces cerevisiae*, role of N-glycosylation on activity, stability and secretion. *Biochem. J.* 329, 65-71.
- 175) Zoecklein, B. W., Marcy, J. E. Williams, J. M. y Jasinski, Y. (1997). Effect of native yeasts and selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* in glycosyl glucose, potential volatile terpenes, and selected aglycones of White Riesling (*Vitis vinifera* L) wines. *J. Food Compos. Anal.* 10, 55-65.

## **8. TRABAJOS PUBLICADOS**

## 8. TRABAJOS PUBLICADOS

- [1] Fernández, M., Ubeda Iranzo, J.F. y Briones Pérez, A.I. (2000). Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in winemaking. *Int. J. Food Microbiol.* 59, 29-36.
- [2] Fernández-González, M., Espinosa, J.C., Ubeda, J.F. y Briones, A.I. (2001). Yeasts present during wine fermentation, comparative analysis of conventional plating and PCR-TGGE. *Syst Appl Microbiol.* 24, 639-644.
- [3] Espinosa, J. C. Fernández-González, M., Ubeda, J.F. y Briones, A.I. (2002). Identification of wine yeast by PCR-RFLP without previous isolation on plate. *Food Tech. Biotechnol.* 40, 157-160.
- [4] Hernández, L. F., Espinosa, J. C., Fernández-González, M. y Briones, A. (2002).  $\beta$ -glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 171-176.
- [5] Fernández-González, M. Di Stefano, R. y Briones, A.I. (2003). Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from muscat must by different yeast species. *Food Microbiol.* 20, 35-41.
- [6] Fernández-González M, Ubeda J.F, Cordero Otero R.R. y Briones, A.I. Study of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *FEMS Yeast Res.* Enviado
- [7] Fernández-González M. y Di Stefano R. Fractionation of glycoside aroma precursors in non aromatic grapes. Hydrolysis and conversion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem.* Enviado.